

Regeneration – eine neue therapeutische Dimension in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Regeneration – A New Therapeutic Dimension in Otorhinolaryngology

**OPEN
ACCESS**



Autoren

Nicole Rotter¹, Marcy Zenobi-Wong²

Institute

- 1 Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsmedizin Mannheim, Universitätsklinikum Mannheim
- 2 ETH Zürich, Gewebetechnologie und Biofabrikation, CH-Zürich

Schlüsselwörter

Regeneration, Regenerative Medizin, Tissue Engineering, HNO-Heilkunde

Key words

Regeneration, Regenerative Medicine, Tissue Engineering, Otorhinolaryngology

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0043-122309>

Laryngo-Rhino-Otol 2018; 97: S185–S199

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York

ISSN 1615-0007

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Nicole Rotter

Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Universitätsmedizin Mannheim

Universitätsklinikum Mannheim GmbH

Theodor-Kutzer-Ufer 1-3

D-68167 Mannheim

nicole.rotter@umm.de

ZUSAMMENFASSUNG

Die Regeneration als therapeutisches Prinzip und damit die Regenerative Medizin ist ein vielversprechender Ansatz künftig die therapeutischen Optionen der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde um eine weitere Dimension zu erweitern. Während heute rekonstruktive chirurgische Verfahren, Medikamente und Prothesen wie bspw. das Cochlea Implantat die Funktionen defekter Gewebe im Kopf-Hals-Bereich ersetzen, sollen durch die Regenerative Medizin die defekten Gewebe und deren Funktion selbst wiederhergestellt werden. In dieser Übersichtsarbeit werden neue Entwicklungen wie das 3D-Bioprinting und dezellularisierte, natürliche Biomaterialien für regenerative Ansätze vorgestellt und durch eine Zusammenstellung aktueller präklinischer und klinischer Studien im Bereich der Regenerativen Medizin in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde ergänzt.

SUMMARY

Regeneration as a therapeutic principle and regenerative medicine in general are promising new strategies to add new therapeutic dimensions to our current treatment options. Today, reconstructive surgery, drugs and implants such as the cochlear implant can replace the functions of damaged tissues. In contrast, regenerative therapies aim at the replacement of the damaged tissues themselves while at the same time replacing their lost tissue function. In this review article new technologies such as 3D-bioprinting and the application of decellularised tissues as biomaterials are introduced and explained. A summary of current preclinical and clinical regenerative studies in otorhinolaryngology is complementing these basic aspects.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	S185	3.2. Rolle von Makrophagen	S190
Summary	S185	4. Regenerative Medizin auf dem Weg in der Klinik	S190
1. Regenerative Medizin	S186	4.1. Überblick	S190
1.1 Prinzipien der Regeneration	S186	4.2. Wieso sind bisher so wenige regenerative Therapien in der klinischen Routine einsetzbar?	S190
1.2 Einführung in die Regenerative Medizin	S186	5. Regenerative Verfahren in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde – aktueller Stand	S191
2. 3D-Bio-Druck (3D-Bioprinting)	S186	5.1. Rhinologie und plastisch-rekonstruktive Chirurgie	S191
2.1 Bio-Druck Techniken und Bio-Tinten	S187	5.2. Laryngologie und Trachealchirurgie	S193
2.2 Bio-Druck Techniken für den Kopf-Hals-Bereich	S188	5.3. Otologie	S194
3. Dezellularisierte Trägermaterialien	S189	5.4. Speicheldrüsen	S195
3.1. Grundlagen und Dezellularisierung	S189	Literatur	S196

ABKÜRZUNGEN

ADSC	adipose derived stem cells - Fettgewebstammzellen
b-FGF	basic fibroblast growth factor
ECM	extrazelluläre Matrix
NIH	National Institutes of Health
PEG	Polyethylenglykol
PRP	platelet rich plasma
SVF	stroma vascular fraction

1. Regenerative Medizin

1.1 Prinzipien der Regeneration

Regeneration bezeichnet die Fähigkeit eines Organismus verlorengegangene Gewebe und Organe zu ersetzen und sollte begrifflich auf Mechanismen beschränkt werden, die die Vorgänge während der Embryogenese und der Fetogenese rekapitulieren [1]. Während diese Fähigkeit beim Menschen und den meisten Säugetieren weitgehend verlorengegangen ist und nur in bestimmten Geweben wie dem Knochenmark, der gastrointestinalen Mukosa, der Leber und der Haut vorkommt [1], sind bspw. Axolotl, mexikanische Salamander in der Lage ganze Gliedmaßen zu regenerieren. Erst kürzlich konnten wesentliche Mechanismen dieser Regeneration aufgedeckt werden [2]. Man geht heute davon aus, dass verschiedene Progenitorzellen mit definiertem Regenerationspotenzial gemeinsam für diese Regeneration verantwortlich sind [3], dass aber auch Makrophagen eine wesentliche Rolle bei diesem Prozess spielen [4].

Nach einer Verletzung beim Menschen laufen entzündliche Prozesse ab und eine Narbe wird gebildet. Im Allgemeinen geht dabei die ursprüngliche Gewebefunktion zumindest teilweise verloren, da das Narbengewebe nicht dem ursprünglichen Gewebe entspricht. Auch das Immunsystem und die Remodellierung der extrazellulären Matrix spielen eine wesentliche Rolle für die Regeneration in anderen Organismen wie z. B. dem Axolotl. Es ist wahrscheinlich, dass die zunehmenden und besseren Kenntnisse dieser Abläufe die Entwicklung regenerativer Strategien zukünftig wesentlich beeinflussen werden [5].

1.2 Einführung in die Regenerative Medizin

Der Begriff Regenerative Medizin und mit ihm die Verwendung der Regeneration als therapeutisches Prinzip ist heute allgemein akzeptiert und wird als einer der vielversprechendsten Bereiche der modernen Biomedizin angesehen. Dennoch existiert bislang keine einheitliche Definition. Die NIH definiert Regenerative Medizin als die Herstellung lebender, funktionaler Gewebe mit dem Ziel Gewebe- oder Organfunktionen wiederherzustellen, die aufgrund von Krankheit, Trauma, kongenitalen Defekten oder Alter verloren gegangen sind (<https://report.nih.gov/NIHfactsheets/ViewFactSheet.aspx?csid=62>). Die Regenerative Medizin hat das Potenzial die Probleme der Organknappheit im Bereich der Organtransplantation zu lösen [6].

Teilweise wird diese Definition heute noch viel weiter gefasst, so dass einzelne Technologien wie Tissue Engineering und die therapeutische Anwendung von Stammzellen nur einige der Aspekte der Regenerativen Medizin darstellen. Auch medizinische Devices können in der Lage sein Regenerationsmechanismen zu induzieren und können im spezifischen Fall auch eine regenerative Therapie darstel-

len. Auch die Gentherapie, wenn sie in der Lage ist regenerative Mechanismen zu aktivieren fällt dann unter den Oberbegriff der Regenerativen Medizin.

Die Regenerative Medizin unterscheidet sich somit grundlegend von den heute üblichen therapeutischen Verfahren die lediglich die Funktion von Geweben ersetzen aber nicht das Gewebe selbst. Verdeutlicht werden kann dies bspw. am Cochlea Implantat. Das Cochlea Implantat ist eine extrem erfolgreiche Neuroprothese, die in der Lage ist die Funktion defekter Haarzellen zu ersetzen, indem sie den Hörnerven direkt elektrisch stimuliert. Das Cochlea Implantat ersetzt also die Funktion des Innenohrs aber nicht das Innenohr selbst. Eine regenerative Therapie für die Innenohrschwerhörigkeit und Taubheit würde im Gegensatz dazu die defekten oder verloren gegangenen Haarzellen ersetzen, sei es durch die Verwendung genterapeutischer Ansätze, durch die Induktion regenerativer Mechanismen oder durch die Differenzierung noch vorhandener oder von extern applizierten Zellen in Haarzellen.

Auch in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde müssen Gewebedefekte nach Trauma, Tumorsektionen oder auch im Rahmen kongenitaler Defekte wiederhergestellt werden. Auch der natürliche Alterungsprozess führt zu Veränderungen, wie z. B. einer Abnahme der Hörschwelle, die behandelt werden müssen. Bisher stehen uns neben chirurgischen und medikamentösen Therapien v. a. im Bereich der Otologie Hörgeräte und Prothesen zur Verfügung, die diese Veränderungen therapieren können. Nahezu alle Bereiche der HNO-Heilkunde können auch das Ziel regenerativer therapeutischer Ansätze sein. Diese reichen von der Otologie, in der gegenwärtig Prothesen sehr erfolgreich für die Wiederherstellung des Hörens verwendet werden bis zur rekonstruktiven Gesichtschirurgie, in der derzeit v. a. komplexe chirurgische Verfahren für die Wiederherstellung verwendet werden. Diese reichen wiederum von der Verwendung lokaler Lappenplastiken und Grafts über die Verwendung gestielter Lappen und mikrovaskulärer Transplantate bis hin zur Gesichtstransplantation [7], die erstmals 2005 erfolgreich durchgeführt wurde. Seither finden sich lediglich 35 weitere in der Literatur beschriebene Fälle von Gesichtstransplantationen [8]. Neue Methoden auf der Basis dezellularisierter Gewebe und regenerativer Therapiestrategien könnten auch hier eine Alternative darstellen [9].

Im Folgenden sollen 2 wesentliche aktuelle Technologien aus dem Bereich der Regenerativen Medizin und ihre Anwendungen, das 3D-Bioprinting und dezellularisierte natürliche Materialien vorgestellt werden.

2. 3D-Bio-Druck (3D-Bioprinting)

Die Regenerative Medizin hat sich mit der Identifikation neuer Stammzellquellen, durch Geneditierungstechnologien sowie durch die Entwicklung von intelligenten, adaptiven und zellinstruierenden Materialien technologisch enorm weiterentwickelt. Die wahrscheinlich größten Fortschritte werden dabei durch Kombinationen dieser Technologien mit der Hilfe von neuen Herstellungsmethoden wie dem Bio-Druck erreicht (► **Abb. 1**) [10]. Mithilfe des 3D-Bio-Drucks können Zellsuspensionen schichtweise auf oder mit Biomaterialien gedruckt werden und so hochkomplexe dreidimensionale Strukturen hergestellt werden [11]. Die möglichen Vorteile von Bio-Druck Verfahren für die rekonstruktive Chirurgie sind unter anderem die reduzierte Hebmorbidity, verkürzte OP-Zeit und ein verbessertes ästhetisches Ergebnis.

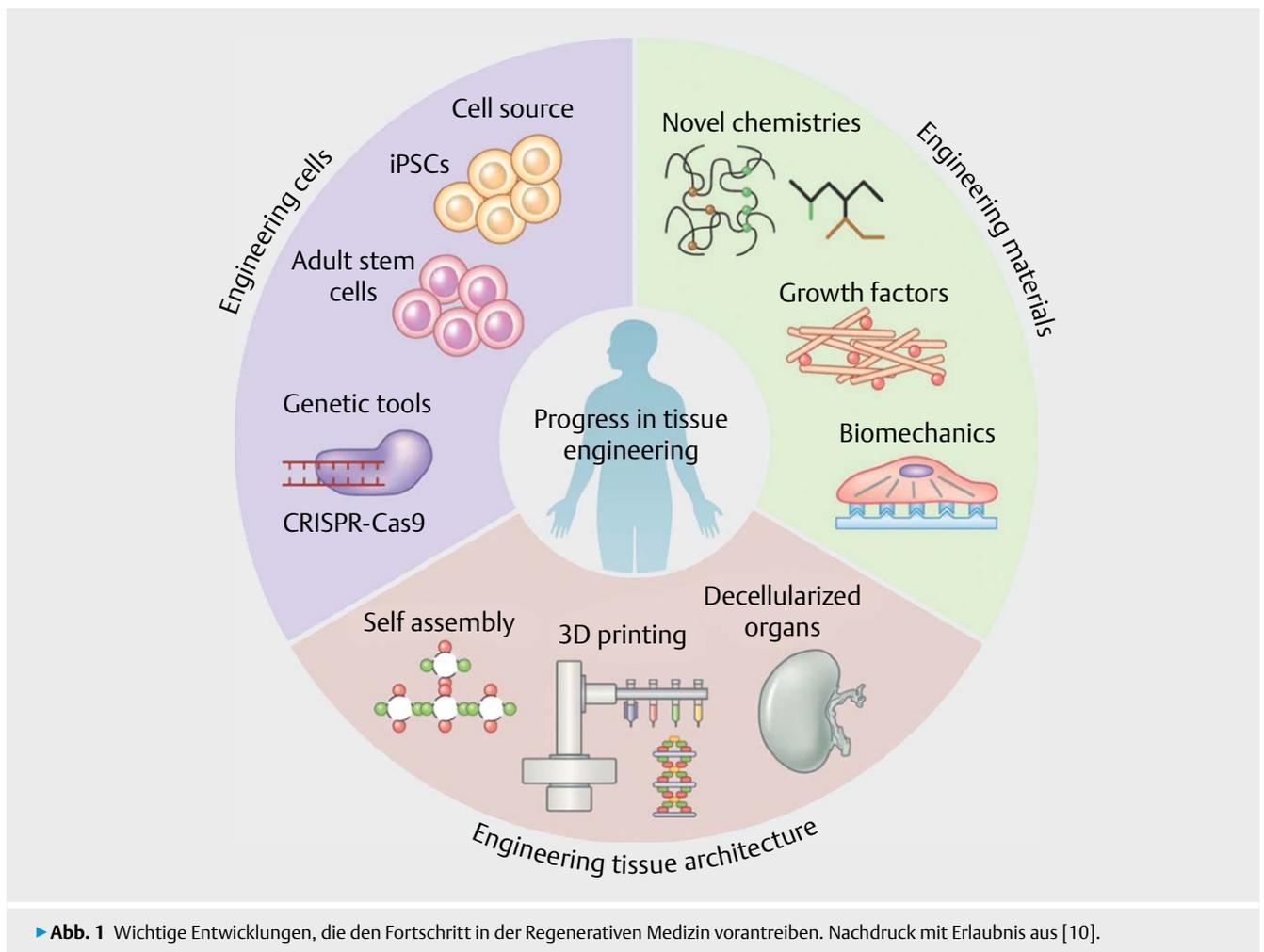
2.1 Bio-Druck Techniken und Bio-Tinten

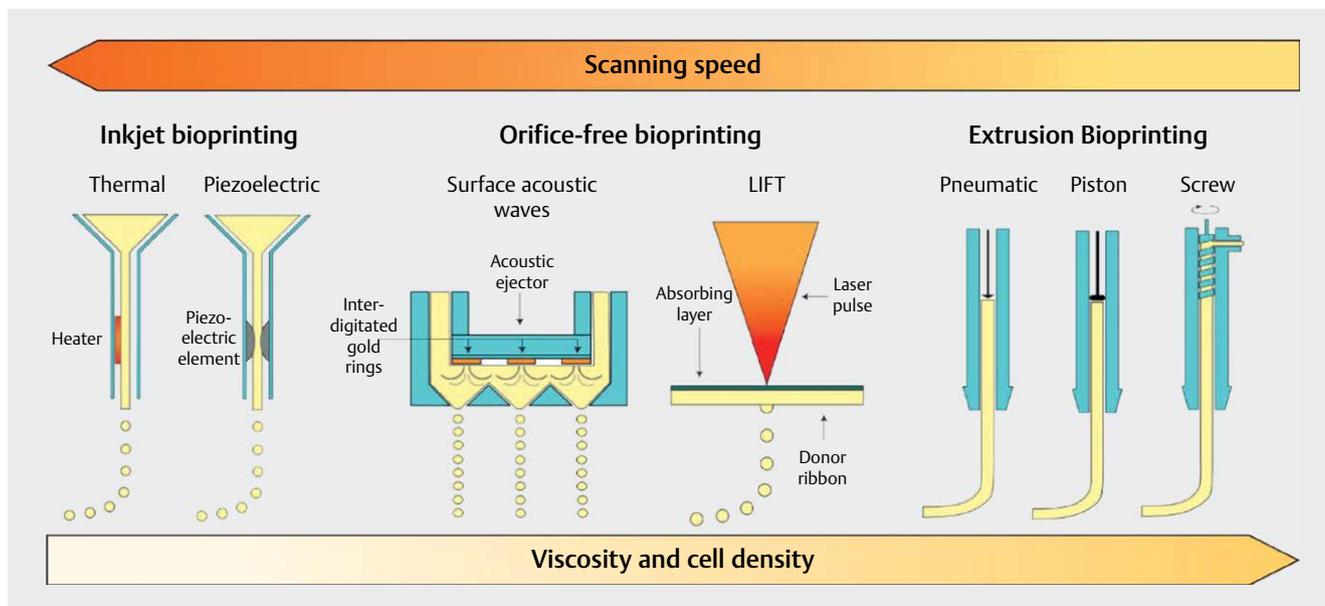
Der 3D-Bio-Druck unterscheidet sich vom konventionellen 3D-Druck durch die Verwendung von sog. Bio-Tinten, die Lösungen aus hydratisierten Polymeren sind, die unter physiologischen Bedingungen in der Gegenwart von Zellen quervernetzt werden können. Das zu druckende 3-dimensionale Gewebe kann z. B. aus MRT- oder CT-Daten oder auch aus Daten von Oberflächenscans von Patienten hergestellt werden. Verschiedene Firmen, wie z. B. Materialise (<http://www.materialise.com>) haben sich auf die Produktion von exakten 3D-Modellen für die chirurgische Planung und für individualisierte Implantate und Prothesen spezialisiert. 3D-Modelle können mit drei unterschiedlichen Bio-Druckverfahren hergestellt werden (► **Abb. 2**). Beim laser-assistierten Bio-Druck (► **Abb. 2** Mitte) wird ein pulsierender Laser über eine Energie-absorbierende Schicht platziert, was dann dazu führt dass Tropfen der zellhaltigen Bio-Tinte auf einem Substrat platziert werden können. In ähnlicher Weise werden beim Tintenstrahl-Druck (► **Abb. 2** links) Tropfen aus Hydrogelen und Zellen durch thermische oder akustische Pulsationen auf ein Substrat aufgetropft. Bei der am häufigsten verwendeten Druckmethode um größere, klinisch-relevante Strukturen herzustellen wird die Mikroextrusionsmethode (► **Abb. 2** rechts) verwendet. Dabei werden Fäden aus Bio-Tinte auf ein Substrat aufgebracht, wobei der Tintenfluss durch den Druck oder die Bewegung einer mechanischen Schraube kontrolliert wird (► **Abb. 2**). Die Eigenschaften der Bio-Tin-

ten, die für die unterschiedlichen Verfahren verwendet werden, variieren erheblich. Materialien für das Tintenstrahl-Drucken und für den laser-induzierten Druck besitzen im Allgemeinen eine niedrige Viskosität und einen niedrigen Zellgehalt, während Bio-Tinten beim Mikroextrusionsverfahren eine höhere Viskosität aufweisen müssen aber auch höhere Zellzahlen enthalten können [12].

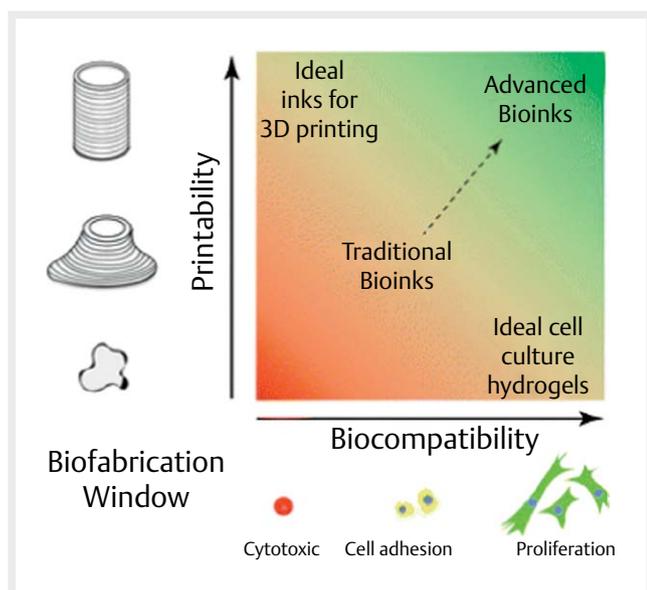
Die Qualität von Organen, die mittels Bio-Druck hergestellt wurden hängt ganz entscheidend von den biologischen und rheologischen Eigenschaften der Bio-Tinte ab. Eine Bio-Tinte muss sowohl eine exzellente Biokompatibilität als auch gleichzeitig eine gute Auflösung beim Drucken besitzen. Diese Eigenschaften, die idealerweise im sogenannten „Bio-Druck Fenster“ („biofabrication window“) liegen sollten, sind nur sehr schwer zu erreichen [13] (► **Abb. 3**).

Hydrogele mit hohem Wassergehalt sind exzellent geeignet um die native Knorpelmatrix nachzuahmen, gleichzeitig sind Chondrozyten in der Lage in Hydrogelen große Mengen extrazellulärer Matrixproteine zu produzieren. Nachteilig ist jedoch, dass Hydrogele nicht mit guter Formgenauigkeit gedruckt werden und zudem sehr weich und mechanisch instabil sind. Andererseits erhalten viele Materialien mit guten Druckeigenschaften diese durch einen hohen Polymergehalt und/oder durch viele Quervernetzungsstellen, die die Diffusion von Nährstoffen behindern und zu einer niedrigen Zellvitalität führen [13] (► **Abb. 3**).





► **Abb. 2** Übersicht über verschiedene 3D-Bio-Druckverfahren. Nachdruck mit Erlaubnis aus [12].



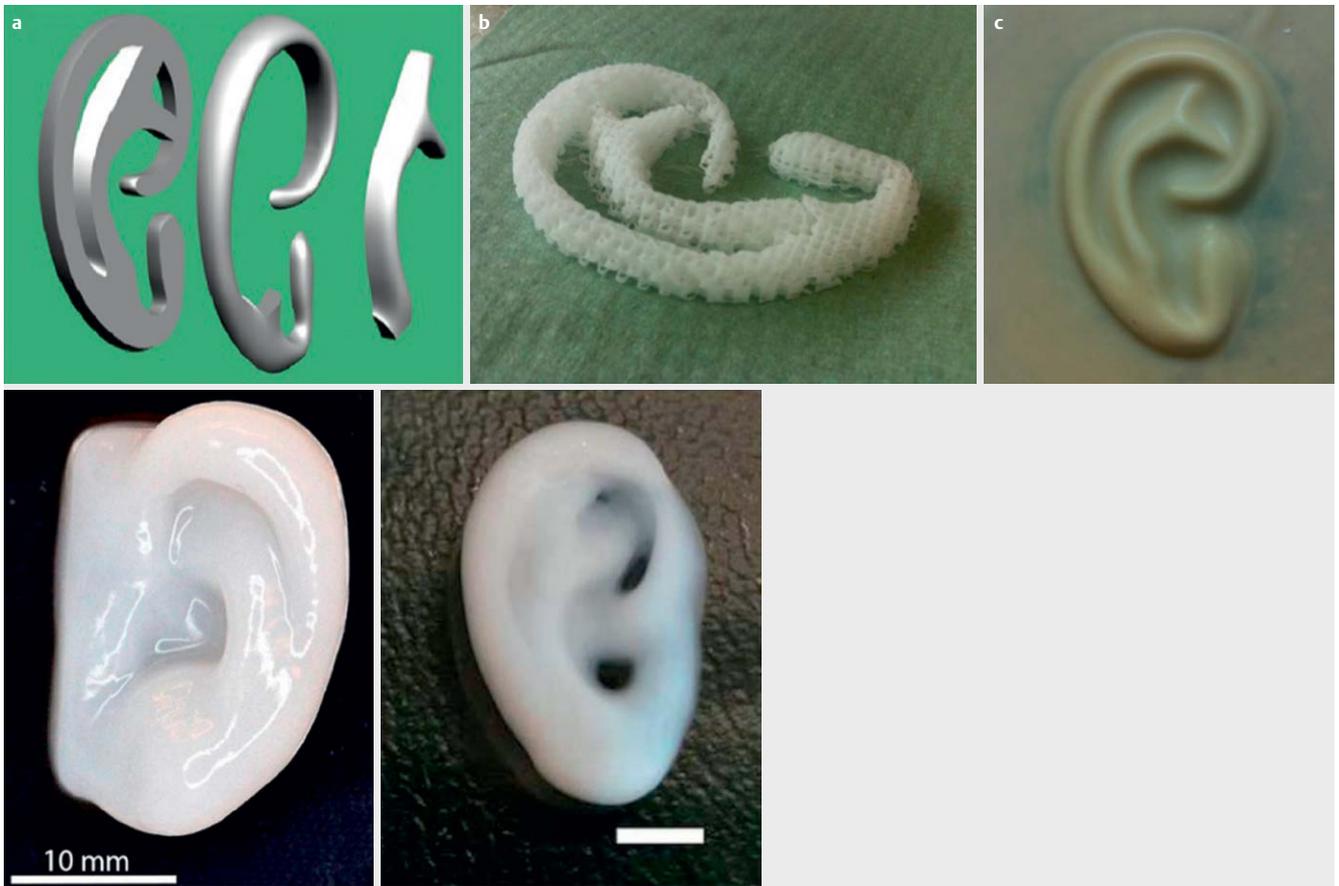
► **Abb. 3** Darstellung des sogenannten Bio-Druck-Fensters („biofabrication window“). Nachdruck mit Erlaubnis aus [13].

Ein vielversprechender Ansatz zur Auflösung dieser Gegensätze ist, die mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen durch die gleichzeitige Extrusion eines thermoplastischen, stabileren Materials zu verstärken [14, 15]. Zusätzlich wird in großem Stil an der Entwicklung besserer Bio-Tinten gearbeitet. So können die biologischen Eigenschaften von Bio-Tinten bspw. durch die Zugabe von dezellularen Matrixpartikeln verbessert werden [16]. Ebenso können Partikel durch ihre Wirkung als Quervernetzer die mechanischen Eigenschaften der Bio-Tinten verbessern [13].

2.2 Bio-Druck Techniken für den Kopf-Hals-Bereich

Moderne Fertigungstechnologien und 3D-Drucktechniken finden bereits Anwendung im Bereich der knöchernen Gesichtsschädelrekonstruktionen und als Planungsinstrumente für komplexe chirurgische Eingriffe [17], darüber hinaus wird der Bio-Druck jedoch vorwiegend im Rahmen experimenteller Untersuchungen eingesetzt [18]. Aufgrund ihrer einzigartigen und komplexen Form, die für das ästhetische Erscheinungsbild essentiell ist, ist die humane Ohrmuschel ein beliebtes Ziel von 3D-Bio-Druckverfahren. Dabei wurde der 3D-Druck bereits als chirurgisches Planungsinstrument für die Ohrmuschelrekonstruktion verwendet [141]. Verschiedene Bio-Druck Ansätze die unterschiedliche Zelltypen wie aurikuläre Chondrozyten [19], mesenchymale Stammzellen [20], induzierte pluripotente Stammzellen [21] und unterschiedliche Materialien wie Nanocellulose und Alginat (► **Abb. 4** unten [22, 23]) verwenden wurden bereits publiziert. Konstrukte die nur aus Hydrogelen hergestellt wurden, sind nach dem Bio-Druck sehr weich und erfordern die weitere Ausreifung in-vitro um ausreichende biomechanische Eigenschaften zu gewährleisten. Thermoplastisch verstärkte Materialien ermöglichen die Herstellung von Konstrukten mit ausreichender biomechanischer Stabilität um den mechanischen Anforderungen durch den Druck der Haut nach der Implantation standzuhalten. Diese Verstärkungen können für die gesamte Ohrmuschel verwendet werden oder um einzelne Teile der Ohrmuschel wie das Cavum conchae, Helix, Tragus oder den Antitragus zu verstärken (► **Abb. 4** oben [142]).

Zusammenfassend ist der Bio-Druck eine äußerst vielversprechende Technologie für Rekonstruktionen im Kopf-Hals-Bereich, mit der vitale und funktionelle, patientenspezifische und individualisierte Transplantate für verbesserte klinische Ergebnisse hergestellt werden können. Gegenwärtig sind jedoch noch keine Produkte auf dem Markt die mit Bio-Druck Verfahren hergestellt werden, auch nur wenige andere tissue engineerete Produkte sind klinisch einsetzbar und erfolgreich. Dies liegt unter anderem an den regulatorischen und finanziellen Hürden die bei der Herstellung derart komplexer Medizinprodukte adressiert werden müssen [24].



► **Abb. 4** Mithilfe von Bio-Druckverfahren hergestellte Ohrmuscheln bzw. Teile von Ohrmuscheln aus verschiedenen Materialien. Oben: Abbildung mit Erlaubnis aus [142], unten rechts: Abdruck aus [22]. Copyright 2015 American Chemical Society, unten links: Abdruck aus [23].

3. Dezellularisierte Trägermaterialien

Trägermaterialien sind ein wesentlicher Bestandteil von in-vitro und in-situ Tissue Engineering Techniken und der Regenerativen Medizin im Allgemeinen. Sie stellen mechanische Stabilität und die spezifische Form des zu ersetzenden Gewebes bzw. Organs bereit. Gleichzeitig sollen sie eine Differenzierung der Zellen erlauben und den Nährstofftransport fördern. Die Anforderungen an Trägermaterialien sind äußerst vielfältig und von der spezifischen Anwendung abhängig [25, 26]. Grundsätzlich werden künstliche von natürlichen Biomaterialien unterschieden [27–29]. In den letzten Jahren wurden biologische Trägermaterialien auf Basis dezellularisierter Gewebe, auch Bioscaffolds genannt, sehr erfolgreich weiterentwickelt und sowohl präklinisch als auch klinisch eingesetzt [30]. Der entscheidende Vorteil dezellularisierter Gewebe ist, dass sie einerseits den natürlichen, komplexen Aufbau der extrazellulären Matrix der Ursprungsgewebe behalten und somit eine exzellente Basis für die in-vivo Besiedelung mit ortsständigen differenzierten und Vorläuferzellen darstellen, andererseits enthalten sie auch noch eine Vielzahl an Signalmolekülen, die eine funktionelle Geweberemodellierung induzieren können [30]. Diese Materialien und ihre Modifikationen haben somit und aufgrund ihrer spezifischen Interaktion mit dem Immunsystem [31, 32] (siehe auch 3.2.) das Potenzial die bisherigen Strategien der Geweberegeneration vollständig zu verändern.

3.1. Grundlagen und Dezellularisierung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus strukturellen und funktionellen Molekülen, die von den ortsständigen Zellen produziert und sezerniert werden [1]. Man weiß mittlerweile, dass die ECM nicht nur strukturelle Voraussetzungen schafft sondern auch eine Vielzahl biologischer Informationen enthält [33] und selbst aktiv für strukturelle und funktionelle Veränderungen der Zellen der ECM verantwortlich ist. Während der Entwicklung und während des Wachstums aber auch als Antwort auf Gewebeerletzungen werden diese Prozesse aktiviert [30]. Die ECM enthält unter anderem Kollagene, Glykoproteine, Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine [30]. Die essentielle Rolle dieser Proteine wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass Mutationen, die die Funktion einzelner Proteine wie z. B. Laminin oder Kollagen inaktivieren häufig letal sind [34]. Die Proteine der ECM als wichtiger Teil des sog. Mikromilieus („microenvironment“) sind in der Lage die Differenzierung von Zellen, darunter insbesondere auch Stammzellen zu beeinflussen [35]. In diesem Zusammenhang wird auch von Stammzellnische gesprochen [35]. Darüber hinaus beeinflusst dieses Mikromilieu aber auch das Immunsystem und hier die Aktivität und Funktion von Makrophagen wie erst kürzlich gezeigt werden konnte [31]. Somit können auf Basis dieser Erkenntnisse neue Biomaterial-basierte Therapien entwickelt werden, die pro-regenerative Immunantworten und somit die gewünschte Geweberegeneration induzieren können [31].

Durch verschiedene chemische, physikalische und enzymatische Methoden können aus Geweben und Organen die ortsständigen Zellen entfernt werden, ein Prozess der Dezellularisierung genannt wird [30]. Es ist heute möglich fast alle Gewebe und Organe zu dezellularisieren und somit gewebespezifische Trägermaterialien herzustellen [36]. Badyal prägte 2011 den Begriff (re-)konstruktive Gewebemodellierung als Entstehung funktionellen lokalisationspezifischen Gewebes unter Zuhilfenahme dezellularisierter Materialien [37].

3.2. Rolle von Makrophagen

Die Rolle von Makrophagen als wesentliche zelluläre Komponente regenerativer Mechanismen wurde in den letzten Jahren unter anderem bei der Gliedmaßenregeneration des Axolotl aufgedeckt [4]. Auch bei der Regeneration der Schwanzflosse im Zebrafisch spielen Makrophagen eine wichtige Rolle [38]. Die Rolle der Makrophagen im Rahmen der menschlichen Wundheilung ist seit langem bekannt. Makrophagen migrieren zur Stelle der Verletzung, reinigen die Wunde durch Phagozytose und initiieren die Vernarbung.

Dennoch wird die Rolle von Makrophagen auch zunehmend im Rahmen der Integration von Biomaterialien aus dezellularisierten Geweben analysiert und als wesentlich für die Regenerative Medizin angesehen [39]. Insbesondere werden seit einiger Zeit die positiven Aspekte der Makrophagenaktivierung erkannt, wobei die Verschiebung des pro-inflammatorischen M1-Phänotyps hin zum anti-inflammatorischen oder remodellierenden M2-Phänotyp einen wesentlichen Aspekt bei der funktionellen Geweberegeneration im Gegensatz zur Narbenbildung darstellt [39]. Diese Erkenntnisse dienen der Herstellung von Biomaterialien, die anstelle einer langdauernden Entzündung einen regenerierenden Phänotyp induzieren können. Insofern sind sie wesentlich für die weitere Entwicklung und Modifikation von Biomaterialien, die insbesondere für die Regeneration von Stützgeweben wie Sehnen, Knochen oder Knorpel essentiell sind.

4. Regenerative Medizin auf dem Weg in der Klinik

4.1. Überblick

Regenerative Verfahren werden zunehmend im Rahmen klinischer Studien eingesetzt, jedoch sind sie bisher lediglich selten in der klinischen Routine zu finden [40].

Die Herstellung von Knorpelgewebe mithilfe von Tissue Engineering Verfahren ist einer der am weitesten entwickelten Bereiche der Regenerativen Medizin. In der Orthopädie findet die autologe Chondrozytenimplantation (ACI) und die matrixbasierte autologe Chondrozytenimplantation (MACI) bereits Anwendung in der klinischen Routine. Das erstmals 1994 von Brittberg et al. im *New England Journal of Medicine* publizierte Verfahren hat sich in den letzten 20 Jahren zu einer eindeutigen klinischen Option entwickelt [41–44]. Es wird als Alternative insbesondere bei jüngeren Patienten mit traumatischen Defekten angesehen. Da die Verwendung von Chondrozyten aus dem Gelenkbereich ein erheblicher Nachteil ist, der sekundäre Probleme im Bereich der Hebestelle hervorrufen kann stehen gegenwärtig nasale Chondrozyten im Fokus des Interesses [45]. Nasale Chondrozyten entstammen der Neuralleiste [46]. Es konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass nasale Chon-

drozyten auch an anderer Lokalisation wie z. B. dem Kniegelenk in der Lage sind ihre Wirkung, d. h. insbesondere die Synthese extrazellulärer Knorpelmatrix zu entfalten und somit als mögliche Zellquelle für die Transplantation geeignet sind [46, 47]. Es wurde bereits eine klinische Phase I Studie [45] durchgeführt, die diese Erkenntnisse auch in der Klinik bestätigt. Aktuell wird eine größere Phase I/II Studie in Basel durchgeführt, die diese Ergebnisse an einem größeren Patientenkollektiv bestätigen soll und die Effektivität der Therapie belegen soll. Nasale Chondrozyten wurden auch für die Rekonstruktion des Flügelknorpels in einer klinischen Phase I Studie eingesetzt [48]. In dieser Untersuchung wurden nasale Septumchondrozyten auf einem Kollagenvlies aus Typ I Kollagen präkultiviert und dann für die Rekonstruktion des Nasenflügels als Flügelknorpeltransplantat in Verbindung mit einem Stirnlappen eingesetzt. Da für die Durchtrennung des Stirnlappens sowie die Verfeinerung und Optimierung des Erscheinungsbildes in jedem Fall ein zweiter und meist auch ein dritter Eingriff erforderlich ist konnte dieser genutzt werden um Gewebe aus dem rekonstruierten Areal zu gewinnen und zu analysieren und hierdurch eine Geweberegeneration auch histologisch nachgewiesen werden.

4.2. Wieso sind bisher so wenige regenerative Therapien in der klinischen Routine einsetzbar?

Ein Vergleich der wissenschaftlichen Publikationen mit unserer klinischen Praxis zeigt klar, dass eine Vielzahl experimenteller und präklinischer Studien zu den unterschiedlichsten Themen publiziert werden die jedoch nicht in der klinischen Praxis anwendbar sind. Eine signifikante Anzahl von Übersichtsarbeiten beschäftigt sich mit der Frage, weshalb die Kommerzialisierung dieser Therapien so schwierig ist [40, 49, 50]. Im Allgemeinen sind die Hürden sowohl im präklinischen, als auch im klinischen, im kommerziellen und regulatorischen Sektor zu suchen [50]. Aus präklinischen Daten kann häufig nur unzureichend auf den Menschen geschlossen werden [50]. Studiendesign, ethische und Sicherheitsbedenken stehen in der Klinik im Vordergrund [51, 52], während die Kommerzialisierung durch steigende Kosten und ein hohes Produktentwicklungsrisiko behindert wird [53]. Ständig wachsende Anforderung an Sicherheit und Effizienz einer Therapie sowie unterschiedliche Regularien in unterschiedlichen Ländern sind wesentliche Probleme im regulatorischen Sektor [54]. Wichtige weitere spezifische Faktoren, die identifiziert wurden beinhalten die unzureichende Förderung von präklinischen und klinischen Studien, das häufig bei Grundlagen- und auch bei klinischen Wissenschaftlern nicht ausreichende Wissen über regulatorische Aspekte, die bei der Durchführung von Studien zur Kommerzialisierung beachtet werden müssen, die fragliche Kostenerstattung neuer Therapien, und die Produktions- und Upscaling Aspekte die für die Kommerzialisierung essentiell sind [40, 49]. Ein entscheidender Erfolgsfaktor ist somit für alle Akteure sich diese Hindernisse bewusst zu machen und sie spezifisch bereits in sehr frühen Forschungs- und Entwicklungsphasen zu adressieren. Dies ist nur durch die enge interdisziplinäre Arbeit und Kooperation mit der Industrie und den regulatorischen Behörden möglich.

Neben den oben genannten Faktoren wird heute ein Umdenken für die gesamte Regenerative Medizin gefordert [55]. Bei vielen experimentellen Untersuchungen wurde die grundlegende vaskuläre, nervale und lymphatische Versorgung nicht oder kaum in die Untersuchungen mit einbezogen, auch das lokale Mikromilieu wurde häu-

fig nicht ausreichend bedacht [55]. Darüber hinaus sind die immunologischen Faktoren häufig durch die Verwendung immuninkompetenter Tiere umgangen worden, die aber für die klinische Anwendung unumgänglich und von entscheidender Bedeutung sind. Es ist somit zukünftig wesentlich die Regenerative Medizin noch interdisziplinärer auszulegen, als das bisher vielfach der Fall war. Entwicklungsbiologisches und immunologisches Wissen, etwa um die Rolle von Makrophagen bei der Gliedmaßenregeneration im Salamander [2, 4] sind hier nur als Beispiele zu nennen. Die enge Kooperation mit Entwicklungsbiologie und Immunologie wird für die Regenerative Medizin zukünftig unabdingbar und für ihr Überleben wesentlich sein.

5. Regenerative Verfahren in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde – aktueller Stand

Im Folgenden soll der Schwerpunkt auf die Bereiche gelegt werden, in denen tatsächlich schon klinische Anwendungen der regenerativen Therapien publiziert wurden oder die präklinischen Versuche sich weit an die Klinik annähern. Zudem soll auf die oben näher dargestellten Verfahren des 3D-Bioprintings und der dezellularisierten Trägermaterialien eingegangen werden sofern diese für die jeweiligen Bereiche relevant sind. Eine Übersicht über klinische Studien der genannten klinischen Anwendungen findet sich in ► **Tab. 1**.

5.1. Rhinologie und plastisch-rekonstruktive Chirurgie

5.1.1. Nase

Defekte im Bereich der Nase können kogenitaler, traumatischer und iatrogener Natur sein. In der Rhinologie und plastisch-rekonstruktiven Chirurgie des Kopf-Hals-Bereichs wurden bereits eine Reihe klinischer Studien, die regenerative Verfahren zur Wiederherstellung von Knorpelgewebe der Nase verwenden durchgeführt und publiziert. Diese beginnen bei der Verwendung autologer Chondrozyten für die Nasenrückenaugmentation [56], die Yanaga et al. erstmals 2004 publizierten. Im Rahmen dieser Publikation wurden acht Patienten beschrieben, bei denen autologe Chondrozyten aus dem Knorpel des Cavum conchae isoliert und amplifiziert wurden sowie anschließend als gelartige Suspension in den Nasenrücken injiziert bzw. einmal als Kinnaugmentation verwendet wurden. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte im Wesentlichen makroskopisch, bzw. einmal auch unter Zuhilfenahme der Magnetresonanztomografie. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2006 [57] wurden weitere Ergebnisse dieser Methode publiziert. Bei 32 Patienten wurde erneut die Suspension aus amplifizierten aurikulären Chondrozyten für die Augmentation der Nase und für weitere Lokalisationen verwendet. Auch hier wurden die Ergebnisse v. a. makroskopisch bewertet. Bei 8 Patienten wurde eine Biopsie aus dem transplantierten Gewebe gewonnen, die Anhalt für die Anwesenheit von Knorpelgewebe ergab. Die wesentlichen Limitationen dieser Studien sind zum einen das unzureichende Studiendesign ohne Kontrollgruppe oder standardisierte Auswertung, zum anderen die fehlende Beschreibung der Zellkulturtechniken, die eine Wiederholung dieser Untersuchungen unmöglich machen. Somit ist es schlicht unmöglich weitergehende Schlussfolgerungen aus diesen Untersuchungen zu ziehen, auch wenn 2013 in einer weiteren Studie der Gruppe von Yanaga [58] die Technik in einer modifizierten Weise erneut bei 18 Patien-

ten angewandt wurde. Diesmal wurde eine leichte Veränderung der Zellkulturmethoden vorgenommen und das Gewebe zunächst in die Bauchwand transplantiert. Nach etwa 6 Monaten wurde das nun von Fettgewebe umgebene transplantierte Gewebe für die Augmentation des Nasenrückens und des Kinns in speziellen Fällen mit besonders dünner Haut verwendet. Es finden sich jedoch bis heute keine Publikationen anderer Autoren, die diese Technik verwendet hätten. Yanaga und Mitarbeiter verwendeten diese Technik jedoch in weiteren Publikationen unter anderem auch zur Herstellung von Ohrknorpel für die Behandlung der Mikrotie (siehe 5.1.2.). 2017 wurde ein Fallbericht von Ceccarelli et al. publiziert [59], die eine Mikrografting-Technik, die für die Versorgung chronischer Wunden patentiert wurde „Rigenera®“ [60] im Rahmen einer offenen Septorhinoplastik, die den Einsatz von Spreadergrafts erforderte, einsetzten. Leider bleiben auch bei dieser Publikation Methodik und Rationale völlig unklar.

Einen wesentlichen Fortschritt und insofern eine bahnbrechende Neuerung stellt die Publikation von Fulco et al. aus dem Jahr 2014 [48] im Lancet dar. Ziel dieser Phase I Studie waren die Sicherheit und Machbarkeit der Methode zu untersuchen. In dieser Studie wurde der Flügelknorpel bei 5 Patienten nach Tumorsektionen mit in-vitro hergestelltem Knorpelgewebe rekonstruiert. Zusätzlich wurde ein Stirnlappen oder ein Nasolabiallappen für die Rekonstruktion der äußeren Haut verwendet. Das Knorpelgewebe wurde dabei aus Nasenseptumknorpel gewonnen, Chondrozyten isoliert und in-vitro vermehrt und dann auf ein Kollagen I Trägervlies (Chondro-Gide, Geistlich Pharma, Wullhusen, Schweiz) aufgebracht. Dieses Trägermaterial wurde bereits für die Verwendung im Gelenkbereich erprobt und zugelassen. Parallel wurden jeweils 2 Scaffolds kultiviert, und ein Scaffold für die Transplantation, das zweite für die Analyse der in-vitro Chondrogenese verwendet, sodass eine Überprüfung der in-vitro Chondrogenese vorgenommen werden konnte. Sechs Monate nach der Rekonstruktion wurde jeweils eine Verfeinerung der Rekonstruktion vorgenommen und dabei auch Gewebe für die Histologie aus dem transplantierten Areal gewonnen. Die Studie wies die Sicherheit und Machbarkeit der Methode nach, zudem ergaben sich erste Hinweise, dass in-vitro hergestelltes Knorpelgewebe noch vor Ort zu finden war, wenn auch in sehr variablem Ausmaß. Die sekundären Outcome-Parameter Patientenzufriedenheit und Stabilität des Flügelknorpels, die anhand des Nasendurchflusses bestimmt wurde gaben ebenfalls Anhalt zur Annahme, dass diese Technik eine Alternative zur klassischen Transplantation von Septum- oder Ohrknorpel für die Rekonstruktion des lateralen Flügelknorpels darstellt. Eine kontrollierte Studie, die diese Ergebnisse verifiziert und verfeinert steht gegenwärtig noch aus.

5.1.2. Ohrmuschel

Defekte der Ohrmuschel treten sowohl kongenital als auch nach Trauma und Tumorsektionen auf. Trotz einer Vielzahl von in-vitro und tierexperimenteller Studien, die belegen, dass es möglich ist Knorpel in der Form einer menschlichen Ohrmuschel herzustellen [61–65] existieren gegenwärtig keine qualitativ hochwertigen Studien, die diese Technik in der Klinik anwenden. Lediglich Yanaga et al. verwendeten die bereits oben (5.1.1.) beschriebene Technik, die auch für die Nasenaugmentation verwendet wurde in modifizierter Weise auch für die Rekonstruktion der Ohrmuschel [66, 67]. Die Autoren isolierten Chondrozyten aus den mikrotischen Ohrmuscheln

► **Tab. 1** Verschiedene Entwicklungsstadien der Regenerativen Medizin im Kopf-Hals-Bereich.

	Fallberichte und Fallserien	Phase I	Phase II/III	Kommerzielles Produkt	Routine
Knorpel-Nase	Nasenrückenaugmentation (n=8; n=32) Yanaga, Japan [57] Spreader Graft (?) (n=1) Ceccarelli, Italien [60]	Nasenflügelknorpelrekonstruktion (n=5) Fulco, Schweiz [48]	-	-	-
Knorpel - Ohrmuschel	Partielle und totale Ohrmuschelrekonstruktion (n=12) Yanaga, Japan [66-67]	-	-	-	-
Nervus facialis	- N. facialis; Läsion bis 3 cm Länge Navissano, Italien (n=7) - NeuroTube [75] - N. facialis Gunn, USA (n=1) - Avance [79] - N. facialis - Stirnast Inada, Japan (n=2) - PGA-Kollagen-Röhre, kein kommerzielles Produkt [77] - Chorda tympani Yamanaka, Japan (n=3) - PGA-Kollagen-Röhre, kein kommerzielles Produkt [78]	-	-	z. B. - PGA: NeuroTube® - Kollagen I: NeuroGen® NeuroMatrix® NeuroFlex® - NeuraWrap® NeuroMend® - Dezell. humanes Allograft Avance®	-
Stimm lippen	-	--	-	-	-
Larynx	-	-	-	-	-
Trachea	12-jähriges Kind, Heilversuch, Hamilton, UK [101-102]	-	-	-	-
Trommelfell	Gelatine + b-FGF, (n=53) Kanemaru, Japan [104]	Gelatine + b-FGF, (n=11) Kanemaru, Japan [106]	Gelatine + b-FGF; laufend nach [106]	Alloderm® Tutopatch® Audiomesh® Surgisis®	-
Mastoid	Kanemaru, Japan (n=10) [115] Kanemaru, Japan (n=26) [117]	-	-	-	-
Speicheldrüsen	PRP + ADSC + SVF intraglandulär Comella, Italien (n=1) [138]	Phase I/II Studienprotokoll Mesenchymale Stammzellen (n=30), Gronhoj, Dänemark [139]	-	-	-

von 4 Patienten und verwendeten diese Zellen zur Herstellung eines Knorpelblocks, der nach subkutaner Injektion der Zellen im Bereich des Abdomens nach 6 Monaten entstand. Aus diesem Knorpelblock wurde dann ohne exakte Beschreibung der Technik ein Ohrmuschelgerüst [68, 69] hergestellt und in das Ohrmuschelareal transplantiert. Nach Angaben der Autoren wurden bisher 12 Patienten behandelt und es kam nach bis zu 6 Jahren postoperativ nicht zu relevanten Resorptionen des so hergestellten Ohrmuschelgerüsts [67].

Gerade für eine so komplexe 3-dimensionale Struktur wie die menschliche Ohrmuschel scheint das 3D-Bioprinting ideal zur Herstellung geeignet. Das Prinzip konnte in ersten Publikationen auch eindrucksvoll gezeigt werden [23]. Ein wesentliches Problem ist jedoch neben der 3-dimensionalen Formgebung auch die umgebende Haut, die häufig ein Problem im Rahmen der klinischen Ohrmuschelrekonstruktion darstellt, da die zur Verfügung stehende Haut meist deutlich dicker ist als die Haut der Ohrmuschel. Ein wichtiges Ziel ist somit die Herstellung eines vaskularisierten Composite Grafts aus Knorpel, einer Verschiebeschicht und Haut.

Auch die Dezellularisierung von Ohrknorpel könnte eine wegweisende Neuerung im Bereich der Ohrmuschelrekonstruktion darstellen. Utomo et al. haben dezellularisierten humanen Ohrknorpel bereits ausführlich charakterisiert [70]. Eigene unveröffentlichte Untersuchungen zeigten jedoch eine unzureichende mechanische Stabilität dezellularisierter Ohrmuscheln nach der Implantation in Kaninchen.

5.1.3. Nervus facialis

Nervenschädigungen im Kopf-Hals-Bereich können traumatisch, tumorös oder auch iatrogenen Natur sein, häufig ist der Nervus facialis betroffen. Die Therapie umfasst End-zu-End-Anastomosen bei geringer Defektstrecke, während bei längeren Defekten, die nicht spannungsfrei adaptiert werden können, die Verwendung autologer Nerven-transplantate heute den Goldstandard darstellt [71]. Die Hebung von autologen Nerven-transplantaten ist mit einer Hebmorbidity, wie sensiblen Defiziten verbunden, auch stehen nicht immer in Länge und Durchmesser passende Transplantate zur Verfügung [72]. Aus diesen Gründen werden auch für die Nervenrekonstruktion regenerative Verfahren als vielversprechende Alternativen angesehen [73]. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl neuer Techniken zur Überbrückung von Nervendefekten („Nervenschienen“) entwickelt. Einige von ihnen haben auch die Klinik erreicht, ohne sich jedoch bislang weiter in die klinische Routine zu verbreiten. Diese Verfahren verfolgen unter anderem das Prinzip eine geeignete Schiene für das Auswachsen der Axone bereitzustellen und gleichzeitig das Einwachsen von Fibroblasten aus der Umgebung zu verhindern [74]. Als Nervenschienen wurden auch z. B. autologe Venen erfolgreich verwendet, jedoch stehen auch diese nicht immer zur Verfügung. Somit sind synthetische Nervenschienen in den Fokus der Forschung gerückt. Resorbierbare Materialien sind vorteilhaft, da Sekundäreingriffe zur Entfernung der nicht-resorbierbaren Materialien vermieden werden können. Polyglykolsäure, die als Bestandteil von chirurgischem Nahtmaterial seit vielen Jahren in der Klinik verwendet wird, wurde als erste resorbierbare Nervenschiene zugelassen (NeuroTube, Synovis, Birmingham). Unter anderem Navissano et al. [75] berichteten über die erfolgreiche klinische Verwendung von NeuroTube bei Läsionen des Nervus facialis bis 3cm. Als negativ werden der Preis, die möglicherweise zu rasche Resorptionsrate und die Gefahr toxischer Ab-

bauprodukte angesehen [73]. Auch Schienen aus Kollagen I wurden in vielen präklinischen Untersuchungen und auch in klinischen Studien verwendet und werden für Defekte bis zu einer Länge von etwa 1,5–2cm als autologen Nerven-transplantaten ebenbürtig angesehen [73]. Derzeit stehen 5 Kollagen Nervenschienen (NeuraGen, NeuroMatrix, NeuroFlex, NeuraWrap, and NeuroMend) für die klinische Anwendung zur Verfügung. Dennoch hat auch ihre Verwendung noch keinen festen Platz im klinischen Alltag, da sie sich zwar bei kurzen Defekten als ebenbürtig zum Nerven-transplantat erwiesen haben, dies jedoch insbesondere bei längeren Defekten (größer als 1,5 cm) noch unklar ist, da die veröffentlichten Studien keine einheitlichen Ergebnisse lieferten [76]. 2007 verwendeten Inada et al. zur Rekonstruktion des Stirnastes des Nervus facialis bei 2 Patienten eine Nervenschiene aus PGA und Kollagen I [77]. Es findet sich auch eine kleine Fallserie (n = 3) von Yamanaka et al., die die Chorda tympani mit einer ähnlichen Nervenschiene aus PGA und Kollagen I erfolgreich rekonstruierten [78]. Beide Präparate sind nicht kommerziell erhältlich oder in Deutschland zugelassen. Gunn et al. beschrieben in einem Fallbericht die Rekonstruktion des tympanalen und mastoidalen N. facialis mit einem dezellularisierten humanem Implantat „Avance“ [79].

Dezellularisierte Nerven-transplantate werden derzeit genauer in präklinischen Studien evaluiert, wobei erste Ergebnisse auf vergleichbare Ergebnisse mit autologen Nerven-transplantaten hindeuten [80, 81]. 3D-Bioprinting Techniken für die Nervenregeneration wurden aufgrund der hervorragenden Möglichkeit zur Herstellung von klar definierten Kanälen auch für diese Anwendung vorgeschlagen [82].

5.2. Laryngologie und Trachealchirurgie

5.2.1. Stimmlippen

Die Stimmlippen sind als schwingungsfähiger und komplex in mehreren Schichten aufgebauter Teil des Larynx für die Respiration und die Phonation verantwortlich. Mechanische Fehlbelastungen, Rauchen, Entzündungen, Bestrahlung oder Intubationen können beispielsweise die Funktion der Stimmlippen erheblich stören und zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität führen [83]. Die Stimmtherapie der verschiedenen Störungen ist nicht immer ausreichend, die chirurgische Therapie ist dagegen stets mit dem Risiko einer zusätzlichen Vernarbung und weiteren Verschlechterung der Stimme vergesellschaftet [84]. Somit ist auch die Behandlung von Funktionsstörungen und Defekten der Stimmlippen ein wichtiges Ziel regenerativer Therapiestrategien. Die Forschung konzentrierte sich bisher schwerpunktmäßig auf die Applikation von bioaktiven Faktoren, Biomaterialien und die Anwendung von Stammzellen [85–87]. Dabei sind die Anforderungen an geeignete Biomaterialien extrem komplex, da einerseits eine ausreichende mechanische Stabilität zur Platzierung im Larynx notwendig ist und andererseits die Schwingungsfähigkeit der Stimmlippe eine sehr große Flexibilität erfordert. Vielfach wurden Hydrogele zur Injektion in die Stimmlippen untersucht [88]. Hierbei spielen natürliche Materialien wie Kollagen und Elastin als Trägermaterial eine wesentliche Rolle sowie ihre Kombination mit Stammzellen oder patienteneigenen Stimmlippen-fibroblasten [89]. Die Applikation von Stammzellen kann dabei durch Injektion oder durch Mobilisation endogener Stammzellen erfolgen [87] und wurde bereits vielfach in Tiermodellen, insbesondere jedoch bei akuten Schädigungen der Stimmlippen untersucht. Klinische Studien stehen in diesem Bereich noch aus.

3D-Bioprinting wurde ebenso wie die Verwendung von dezellularisierten Stimmlippen nur im Rahmen des 3D-Bioprintings und der Dezellularisierung des gesamten Larynx beschrieben [90, 91].

5.2.2. Larynx

Die Herstellung eines artifiziellen Larynx ist aufgrund der Vielfalt der im Larynx vorhandenen Gewebe und der komplexen Funktion des Larynx für die Stimmbildung aber auch für den Schluckvorgang eine große Herausforderung. Andererseits ist derzeit die Wiederherstellung der laryngealen Funktionen nach partieller und totaler Laryngektomie nur partiell möglich und mit großen Einschränkungen für die betroffenen Patienten verbunden. Hamilton und Birchall gehen in einer aktuellen Übersicht davon aus, dass die Therapie des Larynxkarzinoms in den kommenden 10 Jahren durch die Entwicklungen im Bereich der Larynxregeneration entscheidend beeinflusst werden wird [92]. Die Larynxtransplantation ist eine derzeit v. a. theoretische Option, die aufgrund der notwendigen Immunsuppression nur in Ausnahmefällen und nicht für die Rekonstruktion nach Tumorchirurgie in Betracht kommt, aber auch bereits 2-mal in der Literatur beschrieben wurde [93, 94]. Für die Herstellung eines artifiziellen Larynx ist die Herstellung so unterschiedlicher Gewebe wie des knorpeligen Gerüsts, der laryngealen Muskulatur und der laryngealen Schleimhaut in koordinierter Weise erforderlich. Diese Gewebe müssen gleichzeitig mit dem Gefäß- und Nervensystem des Empfängers verbunden werden um die Funktion des Larynx wiederherzustellen. Eine mögliche erfolversprechende Alternative ist die Dezellularisierung eines allogenen Larynx als Trägergerüst, das mit verschiedenen Zellarten besiedelt werden könnte [91]. Ein großer Vorteil dieser Strategie ist, dass das komplexe laryngeale Gerüst und die vielfältigen extrazellulären Matrices der verschiedenen Gewebe als Ausgangspunkt für die Besiedelung zur Verfügung stehen. Ein tierexperimenteller oder klinischer Einsatz dieser Strategie wurde bisher noch nicht publiziert. Eine weitere Option für die laryngeale Rekonstruktion ist die Verwendung von Bioprinting Strategien, deren allgemeine Prinzipien unter 2. ausführlich beschrieben wurden. Für den Larynx existiert hierzu noch keine Literatur, jedoch wurde ein individualisierter Trachealstent aus Polycaprolacton, der mithilfe von Bioprinting hergestellt bereits erfolgreich klinisch eingesetzt [95]. Die weitere Entwicklung in diesem Bereich könnte somit tatsächlich so rasant sein wie von Hamilton und Birchall dargestellt [92].

5.2.3. Trachea

Grundsätzlich können Tumore, Trauma aber auch kongenitale Läsionen dazu führen, dass erhebliche Teile der Trachea wiederhergestellt werden müssen. Da eine Resektion und End-zu-End Anastomose nur bis zu einer Länge von etwa 5 cm bei Erwachsenen möglich ist, stellt auch die Trachea somit ein wichtiges Ziel für regenerative Verfahren dar [96, 97].

Auch wenn die Trachea für einige Zeit als das erste Organ angesehen wurde, das mithilfe von Stammzellen in-vitro hergestellt werden konnte [98] hat sich die Trachealregeneration zum Albtraum der gesamten Regenerativen Medizin entwickelt, da ohne ausreichende präklinische Daten oder auch nur annähernd solide wissenschaftliche Basis Patienten operiert wurden [97]. Die publizierten Daten müssen heute als Wissenschaftsbetrug angesehen werden [99, 100]. Es kann derzeit lediglich ein Fall einer erfolgreichen Anwendung einer dezellularisierten und in-vivo mit autologen Zellen besiedelten Tra-

chea zitiert werden [101]. In diesem Fall wurde ein 12-jähriges Kind, das unter einer kongenitalen langstreckigen Trachealstenose litt mit einer dezellularisierten Trachea behandelt [102]. Das Kind hat nach dieser Behandlung bisher 4 Jahre überlebt, auch wenn multiple Revisionseingriffe erforderlich waren [101].

Auch wenn die Dezellularisierung und auch das 3D-Printing für die Trachea vielversprechende Ansätze bieten sind insbesondere im Bereich der Trachealchirurgie zunächst umfangreiche und sorgfältige experimentelle und präklinische Daten vor weiteren klinischen Anwendungen unabdingbar.

5.3. Otologie

5.3.1. Trommelfell

Trommelfelldefekte können im Rahmen der akuten und chronischen Otitis media, aber auch posttraumatisch oder iatrogen auftreten. Während akute Trommelfelldefekte eine sehr gute Spontanheilungsrate aufweisen, müssen chronische Defekte in der Regel chirurgisch behandelt werden. Obwohl die Behandlung von Trommelfelldefekten durch Knorpel-Perichondrium-Inseltransplantate, Perichondrium-Transplantate oder Muskelfaszien transplantate häufig mit geringer Hebmorbidity und gutem Erfolg möglich ist, ist dennoch ein chirurgischer Eingriff in Lokalanästhesie oder Vollnarkose erforderlich und gelingt nicht immer. Somit ist auch das Trommelfell Ziel der Forschung in der Regenerativen Medizin und es wird nach kosteneffektiven und nicht-chirurgischen Therapieoptionen gesucht [103].

Kanemaru et al. berichteten bereits 2011 über den erfolgreichen klinischen Verschluss von Trommelfellperforationen im Rahmen von chronischen Otitiden in über 98% der behandelten Patienten [104]. In dieser Studie wurde das Trommelfell chirurgisch angefrischt und dann ein an den Defekt angepasster kleiner Block aus Gelatine mit oder ohne basic fibroblast growth factor (b-FGF) appliziert und anschließend mit Fibrinkleber fixiert. Nur der Zusatz von b-FGF ergab diese hohen Verschlussraten, während bei der Kontrollgruppe lediglich eine von 10 Perforationen verschlossen worden war. Von Jackler wurde diese Entwicklung als der möglicherweise größte Fortschritt in der Otologie seit dem Cochlea Implant bezeichnet [105]. Die Ergebnisse der ersten Studie von Kanemaru et al. wurden in einer Folgestudie 2017 bestätigt [106]. In dieser Studie wurden jedoch nur 11 Patienten behandelt und zunächst im Sinne einer Phase I Studie die Sicherheit dieser Therapie analysiert ohne dass dabei therapie-induzierte Nebenwirkungen festgestellt worden wären. Langzeitergebnisse wurden leider bisher nicht publiziert, weiterhin entspricht das Studiendesign insbesondere der Studie aus dem Jahr 2011 nicht den aktuellen Anforderungen an eine Phase I klinische Studie. Dennoch geben beide klinische Studien erste Hinweise darauf, dass eine regenerative Therapie auch für den Verschluss von Trommelfellperforationen sinnvoll sein könnte. Weiterhin wurde eine größere prospektive randomisierte klinische Studie initiiert, die nach Angaben der Autoren derzeit Patienten rekrutiert [106]. Die Technik der Applikation von Gelatine mit b-FGF wurde von den Autoren auch bereits für die Therapie von Gehörgangsdefekten bei 54 Patienten eingesetzt [107]. Leider bleiben auch hier die präklinische Rationale und das Studiendesign ungenau. In der präklinischen Forschung wird auch für die Regeneration des Trommelfells das 3D-Bioprinting verwendet [108] und konnte an Chinchillas für den Verschluss von Trommelfelldefekten verwendet werden. Auch dezellularisierte Gewebe wurden bereits für die Tympanoplastik in präklinischen Untersuchungen und auch einigen klinischen Studien analy-

siert [109, 110]. Insbesondere AlloDerm (LifeCell Corp., USA), ein Produkt aus dezellularisierter menschlicher Haut hat sich als gleichwertig zur Temporalisfaszie im Hinblick auf die Verschlussraten gezeigt [109, 110] bei gleichzeitig kürzerer OP-Zeit [111]. Jedoch ist AlloDerm gegenwärtig in Deutschland nicht für die Tympanoplastik erhältlich. In einer Übersicht von Kaftan werden weitere dezellularisierte Materialien ausführlich dargestellt [112]. Gegenwärtig werden derartige Materialien in Deutschland nicht in größerem Umfang für die Tympanoplastik verwendet. In eigenen Untersuchungen erwiesen sich die akustischen Eigenschaften von dezellularisiertem Knorpelgewebe als vergleichbar mit dem menschlichen Trommelfell oder mit dünnen Knorpeltransplantaten [113]. Jedoch steht das Material noch nicht für klinische Studien zur Verfügung.

5.3.2. Mastoid

Auch das Mastoid ist Ziel der Regenerativen Medizin in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde [114, 115]. Belüftete Mastoidzellen spielen neben der Eustachischen Röhre eine wichtige Rolle für den Druckausgleich im Mittelohr [116]. Ihr Vorhandensein und ihre Funktion können das Entstehen von Cholesteatomen und anderen chronischen Mittelohrerkrankungen verhindern [115]. In einer klinischen Studie wurde 3-dimensionales Hydroxyapatit (3D-HA) bei 10 Patienten zur Rekonstruktion der Mastoidzellen verwendet. Nach 12 Monaten wurden im Rahmen von Second Look Operationen in bis zu 60% wieder epithelisierte Mastoidzellen gefunden [115]. Die Autoren postulieren, dass so auch Fälle sonst nicht optimal behandelbarer chronischer Otitiden behandelt werden könnten. In einer weiteren Studie publizieren Kanemaru et al. 2013 eine positive Wirkung dieser Therapie auch auf die Funktion der Eustachischen Röhre [117]. Bei 26 Patienten wurden neben einer konventionellen Cholesteatom-Sanierung und Tympanoplastik erneut 3D-HA zur Regeneration von Mastoidzellen verwendet. Bei den so behandelten Patienten ließ sich intraoperativ in etwa 70% der Fälle eine verbesserte Tubenfunktion im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Operation nachweisen, während dies nur bei etwa 13% der konventionell behandelten Patienten der Fall war. Darüber hinaus existieren einige weitere präklinische Studien, die andere Materialien wie Poly-DL-Lactid-Poly-Glycolsäure/Polyethylenglycol (PLGA/PEG) [118] oder Polycaprolacton/ β -Tricalciumphosphat (PCL/ β -TCP) [119] für die Rekonstruktion der Mastoidzellen verwenden. 3D-Bioprinting oder dezellularisierte Gewebe wurden bislang nicht für die Mastoidrekonstruktion verwendet.

Zum Thema Regeneration und Erhalt von Haarzellen werden aktuell eine erhebliche Anzahl experimenteller Untersuchungen durchgeführt. Es sind kürzlich wegweisende Untersuchungen zur Innenohrregeneration publiziert worden [120, 121] die zeigen, dass die Regeneration von menschlichen Haarzellen für die Therapie möglich sein könnte. Da ein weiteres Referat zu neuen Therapieformen im Bereich des Innenohrs in diesem Band erscheint wird an dieser Stelle nicht weiter auf die Thematik eingegangen, sondern auf den Artikel „Molekulares Verstehen des Hörens – Was ändert sich für den Patienten?“ von T. Moser und die o. a. Literaturangaben [120, 121] verwiesen.

5.4. Speicheldrüsen

Die Xerostomie nach Radiatio oder Radiojodtherapie stellt eine erhebliche Nebenwirkung dieser Therapien dar und verschlechtert die Lebensqualität der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ganz enorm. Bis heute existiert keine kausale Therapie der Xerostomie, auch stark

verbesserte Bestrahlungsverfahren wie die intensitätsmodulierte Bestrahlung (IMRT) [122, 123] oder die präventive Gabe von Amifostin [124] sind nicht in der Lage die Xerostomie gänzlich zu vermeiden. Neuartige Bestrahlungsverfahren die versuchen die stammzellhaltigen Drüsenareale auszusparen [125] sind noch nicht in der klinischen Praxis verfügbar. Aus diesem Grunde ist auch das Speicheldrüsenewebe ein wichtiges Ziel regenerativer Therapieverfahren. Neben klassischen Tissue Engineering Ansätzen, die versucht haben Drüsenewebe in-vitro herzustellen stehen heute stammzellbasierte Verfahren im Vordergrund [126]. Ein wesentlicher Aspekt der Radiatio und Radiojodtherapie induzierten Schädigung stellt neben einer Fibrosierung der Verlust von Azinuszellen dar, so dass die Speichelsekretion nach diesen Therapien stark reduziert ist [127–129]. Man kann sich nun zu Nutze machen, dass die ursprüngliche Drüsenstruktur noch vorhanden ist und mithilfe von Stammzellen lediglich die Funktion der Speicheldrüsen wiederherstellen.

Es wurden bereits eine Vielzahl präklinischer Studien in unterschiedlichen Tiermodellen mit verschiedenen Zelltypen durchgeführt, die allesamt zeigten, dass Stammzellen nach Gewebeschaden, sei es durch chirurgisches Trauma oder durch Radiatio an den Ort der Schädigung migrieren [130–133] und dort den Gewebeschaden positiv beeinflussen können. Auch eine direkte positive Wirkung der Stammzellen konnte in mehreren Tiermodellen nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von Coppes in Groningen hat grundlegende Erklärungen für den Wirkmechanismus von aus Speicheldrüsen gewonnenen Stammzellen geliefert und auch überzeugend gezeigt, dass diese Zellen in der Lage sind die Speichelproduktion signifikant zu erhöhen [134–137]. Im Jahr 2017 wurden nun auch erstmals 2 Studien publiziert, die Stammzellen für die Regeneration des Strahlenschadens bei Patienten einsetzen [138, 139]. Bei der einen Studie handelt es sich lediglich um einen Fallbericht. Die Autoren applizierten einen Mix aus platelet rich plasma (PRP), Fettgewebstammzellen (ADSC) und die Stroma Gefäß Fraktion (SVF) aus autologem Lipoaspirat in die Glandulae parotidae und die Glandulae submandibulares auf beiden Seiten. Nach 31 Monaten wurden keine schweren Nebenwirkungen berichtet und der Patient wollte nach Angaben der Autoren weiter an der Behandlung teilnehmen. Wesentliche Erkenntnisse im Hinblick auf die Sicherheit oder Wirkung einer derartigen Therapie liefert diese Verwendung des Zellmixes an einem Patienten jedoch nicht [138]. Sinnvoll und notwendig ist die solide Planung einer Phase I Studie, wie dies Autoren aus Dänemark berichten: Sie veröffentlichten das Studienprotokoll einer placebo-kontrollierten, doppelblinden, randomisierten Phase I/II Studie die adulte mesenchymale Stammzellen für die Regeneration des Strahlenschadens bei 30 Patienten nach Radiatio einsetzt (EudraCT, Identifier: 2014-004349-29; ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02513238) [139]. Die klinischen Ergebnisse der Studie stehen derzeit noch aus. Es ist damit zu rechnen, dass auch glanduläre Stammzellen in der nahen Zukunft in ersten Phase I oder Phase I/II Studien eingesetzt werden, sodass die Speicheldrüsenregeneration einer der wenigen Bereiche ist, in dem die Erkenntnisse präklinischer Untersuchungen tatsächlich zu klinischen Studien, wenn auch noch nicht in die klinische Routine gefunden haben.

Aufgrund der aktuellen Entwicklungen im Bereich des 3D-Bioprinting könnten zukünftig auch die Zell- und biomaterialbasierten Tissue Engineering Strategien im Bereich der Speicheldrüsenregeneration wieder neuen Aufschwung erlangen, da sie die Herstellung komplexer 3-dimensionaler Strukturen wie der Speicheldrüsen ermöglichen können [140].

FAZIT

Während bspw. in der Orthopädie regenerative Therapien in klinischen Studien aber auch in der klinischen Routine eingesetzt werden sind in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde trotz einer Vielzahl potentieller Anwendung und einer ebenso großen Vielfalt präklinischer Studien bisher nur wenige Ansätze in klinische Phase I Studien gelangt. Hierzu zählen bisher die Verwendung tissue engineerter Knorpelgewebes für die Rekonstruktion der Nase sowie die Verwendung von Stammzellen für die Speicheldrüsenregeneration nach Radiatio.

Wesentliche Hürden der klinischen Translation und der anschließenden Verbreitung in den klinischen Alltag sind die hohen Kosten die mit derartigen individualisierten regenerativen Therapien verbunden sind. Auch die regulatorischen Voraussetzungen können bisher vielfach noch nicht ausreichend für die klinische Anwendung erfüllt werden. Trotz aller Hindernisse wird die Regenerative Medizin als neue Technologie alle Bereiche der Medizin, so auch die Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in den nächsten Jahren und Jahrzehnten entscheidend verändern. Unabdingbar hierfür ist es die nicht erfolgreichen Strategien zu verlassen und neue gemeinsame Erkenntnisse aus der Zell- und Entwicklungsbiologie mit den Fortschritten der Immunologie und den neuen Technologien wie dem Bioprinting zu verbinden [55].

Danksagung

NR und MZW werden durch eine Förderung des Schweizer Nationalfonds, Nr. CRSII5_173868 gefördert.

Interessenkonflikt

Prof. Dr. Marcy Zenobi-Wong is a founder and consultant for Auregen Biotherapeutics SA.

Literatur

- [1] Londono R, Badylak SF. Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling. *Ann Biomed Eng* 2015; 43: 577–592
- [2] Kragl M, Knapp D, Nacu E et al. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 2009; 460: 60–65
- [3] Voss SR, Epperlein HH, Tanaka EM. *Ambystoma mexicanum*, the axolotl: a versatile amphibian model for regeneration, development, and evolution studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2009; 2009: pdb emo128
- [4] Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 9415–9420
- [5] Atala A, Irvine DJ, Moses M et al. Wound Healing Versus Regeneration: Role of the Tissue Environment in Regenerative Medicine. *MRS Bull* 2010; 35: 8
- [6] Orlando G, Soker S, Stratta R] et al. Will regenerative medicine replace transplantation? *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3:
- [7] Devauchelle B, Badet L, Lengele B et al. First human face allograft: early report. *Lancet* 2006; 368: 203–209
- [8] Devauchelle BL, Testelin SR, Davrou J et al. Face graft? Extrapolation of facial allotransplantation to children. *J Craniomaxillofac Surg* 2016; 44: 925–933
- [9] Duisit J, Maistriaux L, Taddeo A et al. Bioengineering a Human Face Graft: The Matrix of Identity. *Ann Surg* 2017; 266: 754–764
- [10] Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protocols* 2016; 11: 1775–1781
- [11] Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 773–785
- [12] Hölzl K, Lin S, Tytgat L et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* 2016; 8: 032002
- [13] Chimene D, Lennox KK, Kaunas RR et al. Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective. *Annals of Biomedical Engineering* 2016; 44: 2090–2102
- [14] Melchels FPW, Blokzijl MM, Levato R et al. Hydrogel-based reinforcement of 3D bioprinted constructs. *Biofabrication* 2016; 8: 035004
- [15] Visser J, Melchels FP, Jeon JE et al. Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils. *Nat Commun* 2015; 6: 6933
- [16] Pati F, Jang J, Ha DH et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun*. 2014
- [17] Louvrier A, Marty P, Barrabe A et al. How useful is 3D printing in maxillofacial surgery? *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* 2017; 118: 206–212
- [18] Visscher DO, Farre-Guasch E, Helder MN et al. Advances in bioprinting technologies for craniofacial reconstruction. *Trends Biotechnol* 2016; 34: 700–710
- [19] Kesti M, Eberhardt C, Pagliccia G et al. Bioprinting complex cartilaginous structures with clinically compliant biomaterials. *Advanced Functional Materials* 2015; 25: 7406–7417
- [20] Daly A, Critchley S, Rencsok E et al. A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage. *Biofabrication* 2016; 8: 045002
- [21] Nguyen D, Hägg DA, Forsman A et al. Cartilage tissue engineering by the 3D Bioprinting of iPS cells in a nanocellulose/alginate bioink. *Scientific Reports* 2017; 7: 658
- [22] Müller M, Öztürk E, Arlov Ø et al. Alginate sulfate–nanocellulose bioinks for cartilage bioprinting applications. *Annals of Biomedical Engineering* 2016; doi:10.1007/s10439-016-1704-5 1–14
- [23] Markstedt K, Mantas A, Tournier I et al. 3D bioprinting human chondrocytes with Nanocellulose-Alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2015; 16: 1489–1496
- [24] Hourd P, Medcalf N, Segal J et al. A 3D bioprinting exemplar of the consequences of the regulatory requirements on customized processes. *Regenerative Medicine* 2015; 10: 863–883
- [25] Kiyotake EA, Beck EC, Detamore MS. Cartilage extracellular matrix as a biomaterial for cartilage regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2016; 1383: 139–159
- [26] Smith BD, Grande DA. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11: 213–222
- [27] Hiew VV, Simat SFB, Teoh PL. The Advancement of Biomaterials in Regulating Stem Cell Fate. *Stem Cell Rev* 2017. doi:10.1007/s12015-017-9764-y
- [28] Sampath U, Ching YC, Chuah CH et al. Fabrication of porous materials from natural/synthetic Biopolymers and Their Composites. *Materials (Basel)* 2016; 9: 12

- [29] Edgar L, McNamara K, Wong T et al. Heterogeneity of scaffold biomaterials in tissue engineering. *Materials (Basel)* 2016; 9: 5
- [30] Swinehart IT, Badylak SF. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. *Dev Dyn* 2016; 245: 351–360
- [31] Sadtler K, Estrellas K, Allen BW et al. Developing a pro-regenerative biomaterial scaffold microenvironment requires T helper 2 cells. *Science* 2016; 352: 366–370
- [32] Badylak SF. TISSUE REGENERATION. A scaffold immune microenvironment. *Science* 2016; 352: 298
- [33] Bissell MJ, Aggeler J. Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression? *Prog Clin Biol Res* 1987; 249: 251–262
- [34] Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 2010; 341: 126–140
- [35] Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 2506–2519
- [36] Cravedi P, Farouk S, Angeletti A et al. Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials. *Transpl Int* 2017, doi:10.1111/tri.13068
- [37] Badylak SF, Brown BN, Gilbert TW et al. Biologic scaffolds for constructive tissue remodeling. *Biomaterials* 2011; 32: 316–319
- [38] Petrie TA, Strand NS, Yang CT et al. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* 2014; 141: 2581–2591
- [39] Brown BN, Sicari BM, Badylak SF. Rethinking regenerative medicine: a macrophage-centered approach. *Front Immunol* 2014; 5: 510
- [40] Pettitt D, Arshad Z, Davies B et al. An assessment of the factors affecting the commercialization of cell-based therapeutics: a systematic review protocol. *Syst Rev* 2017; 6: 120
- [41] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889–895
- [42] Peterson L, Minas T, Brittberg M et al. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2000, doi:212–234
- [43] Lindahl A, Brittberg M, Peterson L. Health economics benefits following autologous chondrocyte transplantation for patients with focal chondral lesions of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 9: 358–363
- [44] Schuette HB, Kraeutler MJ, McCarty EC. Matrix-Assisted Autologous Chondrocyte Transplantation in the Knee: A Systematic Review of Mid- to Long-Term Clinical Outcomes. *Orthop J Sports Med* 2017; 5: 2325967117709250
- [45] Mumme M, Barbero A, Miot S et al. Nasal chondrocyte-based engineered autologous cartilage tissue for repair of articular cartilage defects: an observational first-in-human trial. *Lancet* 2016; 388: 1985–1994
- [46] Pelttari K, Pippenger B, Mumme M et al. Adult human neural crest-derived cells for articular cartilage repair. *Sci Transl Med* 2014; 6: 251ra119
- [47] Pelttari K, Mumme M, Barbero A et al. Nasal chondrocytes as a neural crest-derived cell source for regenerative medicine. *Curr Opin Biotechnol* 2017; 47: 1–6
- [48] Fulco I, Miot S, Haug MD et al. Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *Lancet* 2014; 384: 337–346
- [49] Dodson BP, Levine AD. Challenges in the translation and commercialization of cell therapies. *BMC Biotechnol* 2015; 15: 70
- [50] Stace ET, Dakin SG, Mouthuy PA et al. Translating Regenerative Biomaterials Into Clinical Practice. *J Cell Physiol* 2016; 231: 36–49
- [51] McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 2001; 414: 129–131
- [52] Leeper NJ, Hunter AL, Cooke JP. Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2010; 122: 517–526
- [53] Frantz S. Embryonic stem cell pioneer Geron exits field, cuts losses. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 12–13
- [54] Kirouac DC, Zandstra PW. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 369–381
- [55] Badylak S. Perspective: Work with, not against, biology. *Nature* 2016; 540: S55
- [56] Yanaga H, Koga M, Imai K et al. Clinical application of biotechnically cultured autologous chondrocytes as novel graft material for nasal augmentation. *Aesthetic Plast Surg* 2004; 28: 212–221
- [57] Yanaga H, Yanaga K, Imai K et al. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 2019–2030 discussion 2031–2012
- [58] Yanaga H, Imai K, Tanaka Y et al. Two-stage transplantation of cell-engineered autologous auricular chondrocytes to regenerate chondrofat composite tissue: clinical application in regenerative surgery. *Plast Reconstr Surg* 2013; 132: 1467–1477
- [59] Ceccarelli G, Gentile P, Marcarelli M et al. In Vitro and In Vivo Studies of Alar-Nasal Cartilage Using Autologous Micro-Grafts: The Use of the Rigena(R) Protocol in the Treatment of an Osteochondral Lesion of the Nose. *Pharmaceuticals (Basel)* 2017; 10:
- [60] Purpura V, Bondioli E, Graziano A et al. Tissue Characterization after a New Disaggregation Method for Skin Micro-Grafts Generation. *J Vis Exp* 2016; doi:10.3791/53579 e53579
- [61] Zhou L, Pomerantseva I, Bassett EK et al. Engineering ear constructs with a composite scaffold to maintain dimensions. *Tissue Eng Part A* 2011; 17: 1573–1581
- [62] Pomerantseva I, Bichara DA, Tseng A et al. Ear-Shaped Stable Auricular Cartilage Engineered from Extensively Expanded Chondrocytes in an Immunocompetent Experimental Animal Model. *Tissue Eng Part A* 2016; 22: 197–207
- [63] Cervantes TM, Bassett EK, Tseng A et al. Design of composite scaffolds and three-dimensional shape analysis for tissue-engineered ear. *J R Soc Interface* 2013; 10: 20130413
- [64] Cao Y, Vacanti JP, Paige KT et al. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100: 297–302 discussion 303–294
- [65] Lee SJ, Broda C, Atala A et al. Engineered cartilage covered ear implants for auricular cartilage reconstruction. *Biomacromolecules* 2011; 12: 306–313
- [66] Yanaga H, Imai K, Fujimoto T et al. Generating ears from cultured autologous auricular chondrocytes by using two-stage implantation in treatment of microtia. *Plast Reconstr Surg* 2009; 124: 817–825
- [67] Yanaga H, Imai K, Koga M et al. Cell-engineered human elastic chondrocytes regenerate natural scaffold in vitro and neocartilage with neoperichondrium in the human body post-transplantation. *Tissue Eng Part A* 2012; 18: 2020–2029
- [68] Firmin F. Ear reconstruction in cases of typical microtia. Personal experience based on 352 microtic ear corrections. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1998; 32: 35–47
- [69] Firmin F. State-of-the-art autogenous ear reconstruction in cases of microtia. *Adv Otorhinolaryngol* 2010; 68: 25–52
- [70] Utomo L, Pleumeekers MM, Nimeskern L et al. Preparation and characterization of a decellularized cartilage scaffold for ear cartilage reconstruction. *Biomed Mater* 2015; 10: 015010
- [71] Ozmen OA, Falcioni M, Lauda L et al. Outcomes of facial nerve grafting in 155 cases: predictive value of history and preoperative function. *Otol Neurotol* 2011; 32: 1341–1346

- [72] Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurotaphy. *Exp Neurol* 2010; 223: 77–85
- [73] Gaudin R, Knipfer C, Henningsen A et al. Approaches to Peripheral Nerve Repair: Generations of Biomaterial Conduits Yielding to Replacing Autologous Nerve Grafts in Craniomaxillofacial Surgery. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 3856262
- [74] Brunelli GA, Vigasio A, Brunelli GR. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery* 1994; 15: 176–178
- [75] Navissano M, Malan F, Carnino R et al. Neurotube for facial nerve repair. *Microsurgery* 2005; 25: 268–271
- [76] Jiang X, Lim SH, Mao HQ et al. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Exp Neurol* 2010; 223: 86–101
- [77] Inada Y, Hosoi H, Yamashita A et al. Regeneration of peripheral motor nerve gaps with a polyglycolic acid-collagen tube: technical case report. *Neurosurgery* 2007; 61: E1105–E1107 discussion E1107
- [78] Yamanaka T, Hosoi H, Murai T et al. Regeneration of the nerves in the arial cavity with an artificial nerve conduit – reconstruction of chorda tympani nerve gaps. *PLoS One* 2014; 9: e92258
- [79] Gunn S, Cosetti M, Roland JT Jr. Processed allograft: novel use in facial nerve repair after resection of a rare racial nerve paraganglioma. *Laryngoscope* 2010; 120: (Suppl 4): S206
- [80] Kusaba H, Terada-Nakaishi M, Wang W et al. Comparison of nerve regenerative efficacy between decellularized nerve graft and nonwoven chitosan conduit. *Biomed Mater Eng* 2016; 27: 75–85
- [81] Wang W, Itoh S, Takakuda K. Comparative study of the efficacy of decellularization treatment of allogenic and xenogenic nerves as nerve conduits. *J Biomed Mater Res A* 2016; 104: 445–454
- [82] Wust S, Muller R, Hofmann S. 3D Bioprinting of complex channels- Effects of material, orientation, geometry, and cell embedding. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103: 2558–2570
- [83] Roy N, Merrill RM, Gray SD et al. Voice disorders in the general population: prevalence, risk factors, and occupational impact. *Laryngoscope* 2005; 115: 1988–1995
- [84] Benninger MS, Alessi D, Archer S et al. Vocal fold scarring: current concepts and management. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 115: 474–482
- [85] Li L, Stiadle JM, Lau HK et al. Tissue engineering-based therapeutic strategies for vocal fold repair and regeneration. *Biomaterials* 2016; 108: 91–110
- [86] Fishman JM, Wiles K, Lowdell MW et al. Airway tissue engineering: an update. *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14: 1477–1491
- [87] Fishman JM, Long J, Gugatschka M et al. Stem cell approaches for vocal fold regeneration. *Laryngoscope* 2016; 126: 1865–1870
- [88] Bartlett RS, Thibeault SL, Prestwich GD. Therapeutic potential of gel-based injectables for vocal fold regeneration. *Biomed Mater* 2012; 7: 024103
- [89] Ling C, Li Q, Brown ME et al. Bioengineered vocal fold mucosa for voice restoration. *Sci Transl Med* 2015; 7: 314ra187
- [90] Hung SH, Su CH, Lee FP et al. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J Voice* 2013; 27: 289–294
- [91] Baiguera S, Confiotti A, Jaus M et al. Development of bioengineered human larynx. *Biomaterials* 2011; 32: 4433–4442
- [92] Hamilton NJI, Birchall MA. Tissue-Engineered Larynx: Future Applications in Laryngeal Cancer. *Curr Otorhinolaryngol Rep* 2017; 5: 42–48
- [93] Farwell DG, Birchall MA, Macchiarini P et al. Laryngotracheal transplantation: technical modifications and functional outcomes. *Laryngoscope* 2013; 123: 2502–2508
- [94] Krishnan G, Du C, Fishman JM et al. The current status of human laryngeal transplantation in 2017: A state of the field review. *Laryngoscope* 2017; 127: 1861–1868
- [95] Zopf DA, Hollister SJ, Nelson ME et al. Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer. *N Engl J Med* 2013; 368: 2043–2045
- [96] Delaere PR, Van Raemdonck D. The trachea: the first tissue-engineered organ? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; 147: 1128–1132
- [97] Delaere P, Van Raemdonck D. Tracheal replacement. *J Thorac Dis* 2016; 8: S186–S196
- [98] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372: 2023–2030
- [99] Vogel G. Trachea transplants test the limits. *Science* 2013; 340: 266–268
- [100] Cyranoski D. Surgeon commits misconduct. *Nature* 2015; 521: 406–407
- [101] Hamilton NJ, Kanani M, Roebuck DJ et al. Tissue-Engineered Tracheal Replacement in a Child: A 4-Year Follow-Up Study. *Am J Transplant* 2015; 15: 2750–2757
- [102] Elliott MJ, De Coppi P, Speggorin S et al. Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet* 2012; 380: 994–1000
- [103] Villar-Fernandez MA, Lopez-Escamez JA. Outlook for Tissue Engineering of the Tympanic Membrane. *Audiol Res* 2015; 5: 117
- [104] Kanemaru S, Umeda H, Kitani Y et al. Regenerative treatment for tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2011; 32: 1218–1223
- [105] Jackler RK. A regenerative method of tympanic membrane repair could be the greatest advance in otology since the cochlear implant. *Otol Neurotol* 2012; 33: 289
- [106] Omae K, Kanemaru SI, Nakatani E et al. Regenerative treatment for tympanic membrane perforation using gelatin sponge with basic fibroblast growth factor. *Auris Nasus Larynx* 2017; 44: 664–671
- [107] Kanemaru S, Umeda H, Kanai R et al. Regenerative treatment for soft tissue defects of the external auditory meatus. *Otol Neurotol* 2014; 35: 442–448
- [108] Kuo CY, Wilson E, Fuson A et al. Repair of Tympanic Membrane Perforations with Customized Bioprinted Ear Grafts Using Chinchilla Models. *Tissue Eng Part A* 2017, doi:10.1089/ten.TEA.2017.0246
- [109] Vos JD, Latev MD, Labadie RF et al. Use of AlloDerm in type I tympanoplasty: a comparison with native tissue grafts. *Laryngoscope* 2005; 115: 1599–1602
- [110] Haynes DS, Vos JD, Labadie RF. Acellular allograft dermal matrix for tympanoplasty. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 13: 283–286
- [111] Fishman AJ, Marrinan MS, Huang TC et al. Total tympanic membrane reconstruction: AlloDerm versus temporalis fascia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132: 906–915
- [112] Kaftan H. [Tympanic membrane reconstruction with non-autogenous transplants and alloplastic materials]. *Laryngorhinootologie* 2010; 89: 562–568 quiz 569-570
- [113] Schwarz D, Pazen D, Gosz K et al. Acoustic Properties of Collagenous Matrices of Xenogenic Origin for Tympanic Membrane Reconstruction. *Otol Neurotol* 2016; 37: 692–697
- [114] Kanemaru S, Nakamura T, Omori K et al. Regeneration of mastoid air cells: clinical applications. *Acta Otolaryngol Suppl* 2004, doi:80-84
- [115] Kanemaru S, Nakamura T, Omori K et al. Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by in situ tissue engineering. *Laryngoscope* 2005; 115: 253–258
- [116] Sade J, Luntz M, Levy D. Middle ear gas composition and middle ear aeration. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 369–373

- [117] Kanemaru S, Umeda H, Yamashita M et al. Improvement of eustachian tube function by tissue-engineered regeneration of mastoid air cells. *Laryngoscope* 2013; 123: 472–476
- [118] Gould TW, Birchall JP, Mallick AS et al. Development of a porous poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid)-based scaffold for mastoid air-cell regeneration. *Laryngoscope* 2013; 123: 3156–3161
- [119] Jang CH, Cho YB, Kim JS et al. Regeneration of mastoid air cells using polycaprolactone/beta-tricalcium phosphate biocomposites: an experimental study. *Laryngoscope* 2012; 122: 660–664
- [120] Lyon J. Hearing Restoration: A Step Closer? *JAMA* 2017; 318: 319–320
- [121] McLean WJ, Yin X, Lu L et al. Clonal Expansion of Lgr5-Positive Cells from Mammalian Cochlea and High-Purity Generation of Sensory Hair Cells. *Cell Rep* 2017; 18: 1917–1929
- [122] Vergeer MR, Doornaert PA, Rietveld DH et al. Intensity-modulated radiotherapy reduces radiation-induced morbidity and improves health-related quality of life: results of a nonrandomized prospective study using a standardized follow-up program. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74: 1–8
- [123] Scott-Brown M, Miah A, Harrington K et al. Evidence-based review: quality of life following head and neck intensity-modulated radiotherapy. *Radiother Oncol* 2010; 97: 249–257
- [124] Riley P, Glenny AM, Hua F et al. Pharmacological interventions for preventing dry mouth and salivary gland dysfunction following radiotherapy. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 7: CD012744
- [125] van Luijk P, Pringle S, Deasy JO et al. Sparing the region of the salivary gland containing stem cells preserves saliva production after radiotherapy for head and neck cancer. *Sci Transl Med* 2015; 7: 305ra147
- [126] Lombaert I, Movahednia MM, Adine C et al. Concise Review: Salivary Gland Regeneration: Therapeutic Approaches from Stem Cells to Tissue Organoids. *Stem Cells* 2017; 35: 97–105
- [127] Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis* 2002; 8: 141–146
- [128] Nagler RM. Effects of head and neck radiotherapy on major salivary glands – animal studies and human implications. *In Vivo* 2003; 17: 369–375
- [129] Redman RS. On approaches to the functional restoration of salivary glands damaged by radiation therapy for head and neck cancer, with a review of related aspects of salivary gland morphology and development. *Biotech Histochem* 2008; 83: 103–130
- [130] Schwarz S, Huss R, Schulz-Siegmund M et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells migrate to healthy and damaged salivary glands following stem cell infusion. *Int J Oral Sci* 2014; 6: 154–161
- [131] Lim JY, Yi T, Choi JS et al. Intraglandular transplantation of bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells for amelioration of post-irradiation salivary gland damage. *Oral Oncol* 2013; 49: 136–143
- [132] Lim JY, Ra JC, Shin IS et al. Systemic transplantation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the regeneration of irradiation-induced salivary gland damage. *PLoS One* 2013; 8: e71167
- [133] Sumita Y, Liu Y, Khalili S et al. Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 80–87
- [134] Pringle S, Nanduri LS, van der Zwaag M et al. Isolation of mouse salivary gland stem cells. *J Vis Exp* 2011, doi:10.3791/2484
- [135] Pringle S, Maimets M, van der Zwaag M et al. Human Salivary Gland Stem Cells Functionally Restore Radiation Damaged Salivary Glands. *Stem Cells* 2016; 34: 640–652
- [136] Nanduri LS, Maimets M, Pringle SA et al. Regeneration of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Radiother Oncol* 2011; 99: 367–372
- [137] Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK et al. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One* 2008; 3: e2063
- [138] Comella K, Bell W. First-in-man intraglandular implantation of stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells plus platelet-rich plasma in irradiation-induced gland damage: a case study. *Int Med Case Rep J* 2017; 10: 295–299
- [139] Gronhøj C, Jensen DH, Glovinski PV et al. First-in-man mesenchymal stem cells for radiation-induced xerostomia (MESRIX): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2017; 18: 108
- [140] Ferreira JN, Rungarunlert S, Urkasemsin G et al. Three-Dimensional Bioprinting Nanotechnologies towards Clinical Application of Stem Cells and Their Secretome in Salivary Gland Regeneration. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 7564689
- [141] Flores RL, Liss H, Raffaelli S et al. The technique for 3D printing patient-specific models for auricular reconstruction. *PlumX Metrics* 2017; 6: 937–943
- [142] Otto IA, Melchels FPM, Randolph MA et al. Auricular reconstruction using biofabrication-based tissue engineering strategies. *Biofabrication* 2015; 7 (3)