

Aus der Abteilung
Handchirurgie, Plastische und Ästhetische Chirurgie
Klinikum der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Riccardo E. Giunta

**Der Einfluss hypoxisch präkonditionierter multipotenter
Vorläuferzellen aus Fettgewebe auf die periphere
Nervenregeneration im Modell eines künstlich erzeugten Defekts
des Nervus ischiadicus der Ratte**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Julius Michael Mayer
aus
Wangen im Allgäu
2023

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. Thomas Holzbach

Mitberichterstatter: PD Dr. Katharina Vill
Prof. Dr. Ralf Huss

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Christian Krug

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2023

Affidavit



Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Mayer, Julius Michael

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der Einfluss hypoxisch präkonditionierter multipotenter Vorläuferzellen aus Fettgewebe auf die periphere Nervenregeneration im Modell eines künstlich erzeugten Defekts des Nervus ischiadicus der Ratte

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bern, 23.01.2023

Julius M. Mayer

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch).....	1
2	Publikationsliste	2
2.1	Veröffentlichungen der kumulativen Dissertation	2
2.2	Wissenschaftliche Präsentationen von Teilen der Arbeit.....	3
3	Einleitung	6
3.1	Die Bedeutung peripherer Nervenverletzungen	6
3.2	Klassifikation peripherer Nervenläsionen und das klinisch therapeutische Konzept.....	8
3.3	Der Einsatz von Stamm- und Vorläuferzellen als supportive Maßnahme in der peripheren Nervenregeneration	13
3.4	Die Bedeutung präkonditionierender Maßnahmen für ADSPCs..	15
3.5	Fibrinkleber als Trägermedium für ADSPCs in der peripheren Nervenregeneration.....	17
3.6	Zielsetzungen und Eigenanteil der Veröffentlichungen	19
4	Zusammenfassung	21
4.1	Zusammenfassung in deutscher Sprache	21
4.2	Zusammenfassung in englischer Sprache	24
5	Veröffentlichung I	26
6	Veröffentlichung II	27
7	Literaturverzeichnis	28
8	Danksagung.....	36

1 Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch)

ADSPCs	Adipose-derived stem/progenitor cells
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
HIF-1- α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
M./Mm.	Musculus/Musculi
N./Nn.	Nervus/Nervi
NGF	Nerve growth factor
NTF3	Neurotrophin 3
SFI	Sciatic function index
SSI	Static sciatic index
VEGF	Vascular endothelial growth factor

2 Publikationsliste

2.1 Veröffentlichungen der kumulativen Dissertation

Co-Autorenschaft: Originalarbeit

Saller MM, Huettl RE, **Mayer JM**, Feuchtinger A, Krug C, Holzbach T, Volkmer E (2018) Validation of a novel animal model for sciatic nerve repair with an adipose-derived stem cell loaded fibrin conduit. *Neural Regen Res* 13(5):854-861.

Erstautorenschaft: Originalarbeit

Mayer JM*, Krug C*, Saller MM, Feuchtinger A, Giunta RE, Volkmer E*, Holzbach T* (2023) Hypoxic pre-conditioned adipose-derived stem/progenitor cells embedded in fibrin conduits promote peripheral nerve regeneration in a sciatic nerve graft model. *Neural Regen Res* 18(3):652-656. (*geteilte Erst-/Letztautorenschaft)

2.2 Wissenschaftliche Präsentationen von Teilen der Arbeit

09/2020 Hypoxically preconditioned adipose-derived stem/progenitor cells (ADSPCs) embedded in fibrin conduits promote peripheral nerve regeneration in a sciatic nerve graft model in rats

J. Mayer, C. Krug, M. Saller, A. Feuchtinger, R. Giunta, E. Volkmer, T. Holzbach

56. Congress of Swiss Plastic Surgery (SGPRAC-SSCPRE) & 8. Congress of Swiss Aesthetic Surgery (SGAC-SSCE), Lausanne (CH), Vortragspräsentation

10/2017 Verbesserung der Nervenregeneration nach autologer Nerven-
transplantation im Rattenmodell durch Fettstammzellen

E. Volkmer, J. Mayer, A. Beer, T. Holzbach, R. Giunta, C. Krug, M. Saller

58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Handchirurgie, München, Vortragspräsentation

07/2017 Improving regeneration after nerve-transplantation: The impact of hypoxically preconditioned stem/precursor cells in a rat model

E. Volkmer, M. Saller, A. Beer, J. Mayer, C. Krug, T. Holzbach, R. Giunta,

EUROHAND 2017 – 22. FESSH & 12. EFSHT Congress, Budapest (HUN), Vortragspräsentation

- 07/2017 Cell-loaded custom made fibrin glue nerve conduits optimize the repair of peripheral nerves in a sciatic nerve graft model in rats.
- J. Mayer**, C. Krug, M. Saller, A. Feuchtinger, E. Volkmer, R. Giunta, T. Holzbach
- International Symposium on Peripheral Nerve Regeneration, Barcelona (ESP), Vortragspräsentation
- 09/2016 Zellbesiedelte Fibrinkleber-Konduite optimieren die periphere Nervenregeneration im Modell des Nervus ischiadicus-Transplantats bei Versuchsratten
- J. Mayer**, C. Krug, E. Volkmer, M. Saller, A. Aszodi, R. Giunta, T. Holzbach
47. Jahrestagung der DGPRÄC & 21. Jahrestagung der VDÄPC, Kassel, Vortragspräsentation
- 09/2016 Verbesserung der Nervenregeneration nach autologer Nerven-
transplantation im Rattenmodell durch hypoxisch präkonditionierte
Fettgewebs-Progenitorzellen im Fibrin-Konduit
- E. Volkmer**, A. Beer, C. Krug, M. Saller, J. Mayer, T. Holzbach, R. Giunta
57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Handchirurgie, Frankfurt am Main, Vortragspräsentation

- 07/2016 Zellbesiedelte Fibrinkleber-Konduite optimieren die periphere Nervenregeneration im Modell des Nervus ischiadicus Transplants bei Versuchsratten
- J. Mayer**, C. Krug, E. Volkmer, M. Saller, A. Aszodi, R. Giunta, T. Holzbach
93. Jahrestagung Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V., München, Vortragspräsentation
-
- 07/2016 Zellbesiedelte Fibrinkleber Konduite optimieren die periphere Nervenregeneration im Modell des Nervus Ischiadicus Transplantats bei Versuchsratten
- J. Mayer**, C. Krug, E. Volkmer, M. Saller, A. Feuchtinger, A. Aszodi, R.E. Giunta, T. Holzbach
6. Münchener Symposium für Experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und Forschung, München, Posterpräsentation

3 Einleitung

3.1 Die Bedeutung peripherer Nervenverletzungen

Schwerwiegende Traumata, insbesondere der Extremitäten, können mit Verletzungen des peripheren Nervensystems einhergehen (Robinson, 2000). Das Ausmaß verletzungsbedingter Beeinträchtigungen der peripheren neuralen Strukturen reicht dabei von spontan regredienten Sensibilitätsdefiziten bis hin zu persistierenden Lähmungen und/oder neuropathischen Schmerzen der betroffenen Körperregion (Mackinnon, 2015). Unzureichende axonale Regeneration nach peripherer Nervenverletzung und der damit verbundene Organfunktionsschaden können die Lebensqualität und Erwerbsfähigkeit des Patienten in bedeutendem Maß mindern. Dies ist von sozialer und volkswirtschaftlicher Relevanz (Raza et al., 2020). Aufgrund dessen erfolgten enorme wissenschaftliche Bemühungen, um die periphere Nervenregeneration zu verbessern. Der klinische Einsatz von autologen Nerventransplantaten zur Überbrückung von Kontinuitätslücken, End-zu-Seit-Koaptationen oder die Technik des Nerven- und Muskeltransfers, sind Beispiele wichtiger Errungenschaften in der Behandlung peripherer Nervenverletzungen. Die Erforschung allogener Transplantate, artifizieller Nervenöhlen und die Anwendung supplementärer Maßnahmen, wie das Einbringen von Wachstumsfaktoren oder Zellen, sind weitere Beispiele für das Bestreben die axonale Regeneration zu verbessern (Gordon et al., 2003; Campbell, 2008; Dornseifer et al., 2011; Brooks et al., 2012; Daly et al., 2012; Braga Silva et al., 2017; Bingham et al., 2019; Midha and Grochmal, 2019). Darüber hinaus prägten die Weiterentwicklung mikrochirurgischer Techniken, der Einsatz verfeinerter Instrumente und ein tieferes Verständnis für Regenerationsprozesse den Fortschritt in der Therapie von peripheren Nervenverletzungen. Dennoch kann es, besonders bei ausgeprägten Verletzungen von peripheren Nerven, auch bei einer, aktueller Leitlinien entsprechenden Behandlung zu insuffizienter Regeneration von Sensibilität und Motorik kommen (Wüstner-Hofmann, 2013).

Der physiologische Reparaturmechanismus, der nach axonaler Schädigung einsetzt, wird als Waller-Degeneration bezeichnet (Mackinnon, 2015). Es erfolgt ein vollständiger Abbau des Axonabschnitts mitsamt seiner Myelinscheide von dem

proximal der Läsion nächstgelegenen Ranvier'schen-Schnürring bis hin zum innervierten Zielorgan reichend (Mackinnon, 2015). Eine nicht umkehrbare Kaskade eines komplexen Zusammenwirkens zellulärer Bestandteile wie Makrophagen, Schwann-Zellen und azellulären, modulierenden Cytokinen sowie neurotrophen Wachstumsfaktoren (u. a. Nerve growth factor (NGF), Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin 3 (NT-3), Ciliary neurotrophic factor (CNTF) und Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)) sorgt nach der Axonolyse für die Aussprossung des neuen Axons (Frostick et al., 1998; Terenghi, 1999; Hoke et al., 2006; Madduri and Gander, 2010; Mackinnon, 2015).

Die axonale Regenerationsgeschwindigkeit beträgt bei Menschen 1-2 mm / Tag. Irreversible Veränderungen der Zielmuskulatur und somit der Funktionalität treten bereits nach 12-18 Monaten auf und wichtige Komponenten für den Prozess der nervalen Heilung, wie Schwann-Zellen, büßen im zeitlichen Verlauf an regenerativem Vermögen ein (Campbell, 2008; Sulaiman and Gordon, 2009). Das kann dazu führen, dass das Zielorgan besonders bei weit proximalen Nervenverletzungen droht nerval und trophisch zu „verhungern“. Die Diskrepanz der Notwendigkeit einer Innervation am Zielorgan und der langsamen axonalen Aussprossung bleibt eine zentrale Herausforderung. Periphere Nerven sprießen aus, aber sie wachsen potentiell zu langsam um eine Restitution zu ermöglichen, die theoretisch möglich wäre, falls die Zielstrukturen rechtzeitig, vor dem irreversiblen Stadium der Schädigung von den regenerierenden Nervenfasern erreicht werden würden (Mackinnon, 2015).

3.2 Klassifikation peripherer Nervenläsionen und das klinisch therapeutische Konzept

Schweregrad, bestimmt durch den Schädigungsmechanismus, und Lokalisation der Nervenverletzung sind Determinanten für die Morbidität, das Regenerationspotenzial und die therapeutische Strategie (Mackinnon, 2015; Chung, 2019).

Für das Verständnis von Schweregrad-Klassifikationen ist der anatomische Aufbau eines peripheren Nervs grundlegend. Periphere Nerven bestehen aus Afferenzen und Efferenzen. Vom Zellkörper, der rückenmarksnah liegt, ziehen Nervenfasern, so genannte Axone, in die Peripherie zu ihren zu innervierenden Zielstrukturen. Die Axone liegen in einer Gliascheide und sind von Bindegewebschichten umhüllt. Schwann-Zellen, welche der Gruppe der Gliazellen zugeordnet werden, bilden die variabel dicke Markscheide myelinisierter Axone. Im Bereich des Ranvier'schen Schnürring grenzen zwei benachbarte Schwann-Zellen aneinander. Das Endoneurium ist die innerste bindegewebige Hüllschicht, die das myelinisierte Axon umgibt. Mehrere Nervenfasern bilden ein Nervenfaserbündel, das seinerseits von der Hüllschicht des Perineuriums umschlossen ist. Die äußere Hüllschicht des peripheren Nervs wird als Epineurium bezeichnet (Aumüller et al., 2017; Deller et al., 2018). Abbildung 1 dient hierbei der Verdeutlichung (Lundborg, 1988; Lee and Wolfe, 2000).

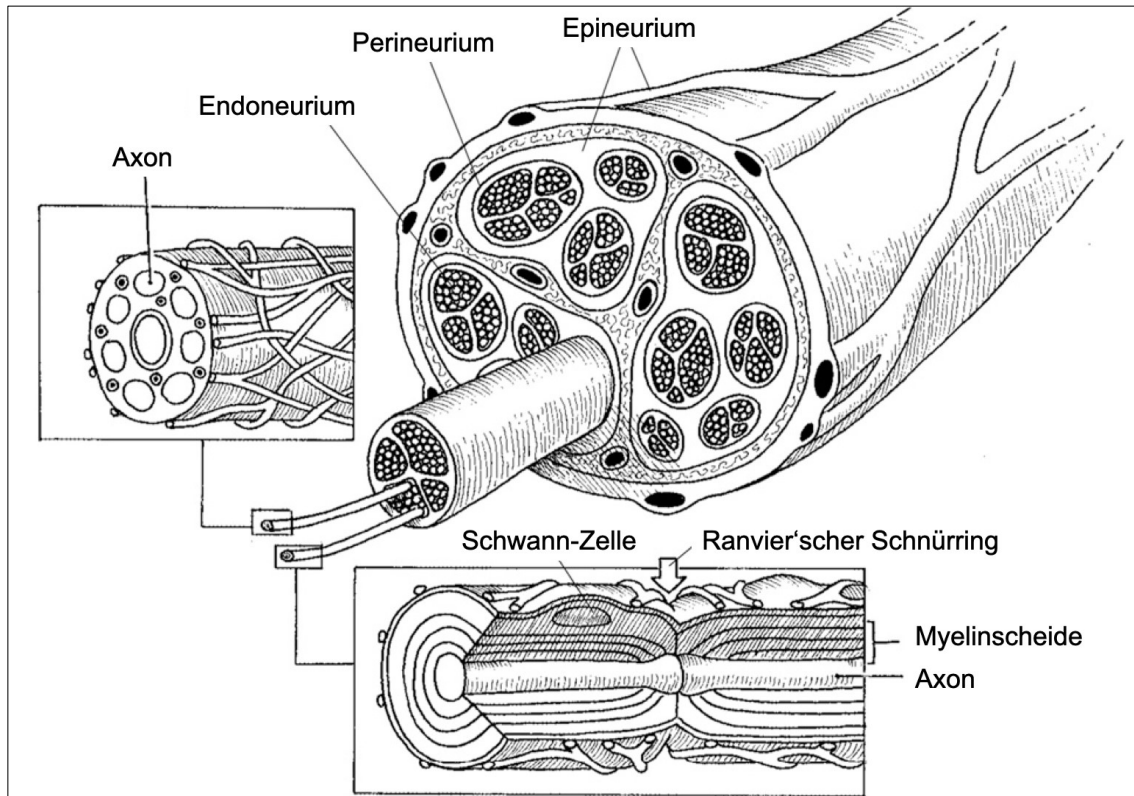


Abbildung 1: Querschnitt eines peripheren Nervs. Vergrößerte Illustrationen einer nicht-myelinisierten Nervenfaser links und einer myelinisierten Nervenfaser unten. Mit freundlicher Genehmigung durch Wolters Kluwer Health Inc. modifiziert / mit übersetzter Beschriftung aus Lee, S. K., & Wolfe, S. W. (2000). *Peripheral nerve injury and repair. J Am Acad Orthop Surg*, 8(4), 243-252; Lundborg, G. (1988). *Nerve Injury and Repair: Churchill Livingstone*, 33.

Eine Klassifikation des Schweregrades peripherer Nervenverletzungen in Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis erfolgte bereits 1943 durch Seddon (Seddon, 1943).

Neurapraxie, die mildeste Variante der peripheren Nervenverletzungen, wird meist durch Kompression verursacht. Es liegt eine transiente, lokale Leitungsblockade bei potenzieller Schädigung der Myelinscheide, jedoch ohne axonalem Schaden, vor. Die unter 3.1. beschriebene Waller-Degeneration setzt bei diesem Schweregrad nicht ein und eine spontane Wiederherstellung der Funktion erfolgt innerhalb von wenigen Wochen. Seddon definierte die Axonotmesis als Verletzung bei der ein axonaler Kontinuitätsverlust bei erhaltenem endo- und perineuralem Gewebe vorliegt, so dass eine spontane Regeneration erfolgen kann. Nach stattgefundener Waller-Degeneration kann eine Axonaussprossung ent-

lang der erhaltenen Leitstrukturen des endo- und perineuralen Bindegewebes erfolgen. Die Neurotmesis, als schwerwiegendste periphere Nervenläsion, beschreibt eine vollständige Durchtrennung des Nervs mit Unterbrechung der Kontinuität des Axons, Endo-, Peri- und Epineuriums. Dies macht eine spontane Regeneration unwahrscheinlich, da keine zielgerichtete Axonaussprossung möglich ist. Es resultiert ein schlechtes funktionelles Ergebnis des ehemals innervierten Zielorgans, sofern keine chirurgisch-rekonstruktive Intervention erfolgt (Seddon, 1943).

Zur genaueren Differenzierung der Schädigung hinsichtlich der oben beschriebenen Hüllstrukturen – Endo-, Peri- und Epineurium – des Nervs postulierte Sunderland 1951 eine Erweiterung der Klassifikation von Nervenschäden aus histopathologischer Perspektive in fünf Grade (Sunderland, 1951). Diese Klassifikation wurde ihrerseits 1988 durch Mackinnon et al. um einen Klassifikationsaspekt, der ein kombiniertes Verletzungsbild der einzelnen Nervenfaserbündel eines Nervs beschreibt, erweitert (siehe Tabelle 1) (Mackinnon and Dellon, 1988). Bei der hier vorliegenden Arbeit steht die Degeneration nach Neurotmesis, respektive Sunderland Typ 5, im Fokus der Untersuchung.

Seddon	Sunderland (Grad)	Verletzungsmuster	Regeneration
Neurapraxie	I	Transiente Leitungsblockade, potenzielle Myelinscheidenschädigung	Spontan und vollständig (< 12 Wo.)
Axonotmesis	II	Axonaler Kontinuitätsverlust, Endo- und Perineurium intakt	Spontan und vollständig (1 mm / d)
	III	Axon und Endoneurium geschädigt, Perineurium intakt	Abhängig von der endoneuralen Vererbung
	IV	Axonaler, endo- und perineuraler Kontinuitätsverlust, Epineurium intakt	Ohne chirurgische Intervention unwahrscheinlich
Neurotmesis	V	Vollständiger Kontinuitätsverlust des Nerven	Ohne chirurgische Intervention höchstunwahrscheinlich
	VI nach Mackinnon	Variables Verletzungsmuster (I-V)	Abhängig vom Verletzungsmuster

Tabelle 1: Periphere Nervenverletzungen nach Seddon, Sunderland und Mackinnon (mod. n. Seddon, 1943; Sunderland, 1951; Mackinnon and Dellon, 1988; Krug et al., 2015).

Im Falle einer viertgradigen Verletzung nach Sunderland oder vollständigen Durchtrennung (Sunderland Grad V) eines peripheren Nerven bedarf es einer operativen Intervention, um Nervenregeneration zu ermöglichen (Mackinnon, 2015). Es sollte, sofern das Verletzungsmuster dies zulässt, eine spannungsfreie epineurale und gegebenenfalls perineurale End-zu-End-Nervenkoaptation der Stümpfe erfolgen (Diao and Vannuyen, 2000). Liegt ein Nervensubstanzdefekt kritischer Länge vor, der eine primäre End-zu-End-Koaptation nicht gewährt, so ist das autologe Nerven transplantat zur Wiederherstellung der Kontinuität das therapeutische Mittel der Wahl (Lee and Wolfe, 2000). Auch wenn theoretisch jeder sensible periphere Nerv des Körpers als Interponat verwendet werden kann, sind neben dem wohl am häufigsten eingesetzten N. suralis, folgende sensibel innervierenden Nerven potenzielle Spendernerven: N. saphenus, N. cutaneus femoris lateralis, N. cutaneus antebrachii medialis und N. cutaneus antebrachii lateralis (Lee and Wolfe, 2000). Neben guter Zugänglichkeit des Spendernervs, ist stets die in Kauf zu nehmende Morbidität an der Entnahmestelle zu

beachten und abzuwägen. Die therapeutische Technik der autologen Nerven-
transplantation wird mittels des angewandten tierexperimentellen Modells dieser
Arbeit imitiert und stellt somit den Ausgangspunkt der Versuche dieser Disserta-
tion dar.

3.3 Der Einsatz von Stamm- und Vorläuferzellen als supportive Maßnahme in der peripheren Nervenregeneration

Die Verwendung von Stamm- und Vorläuferzellen zur Unterstützung regenerativer Prozesse wie zum Beispiel nach Knochen-, Knorpel-, Weichteilschädigung, ischämischer Organschädigung oder Verletzung von Nervengewebe des zentralen wie auch peripheren Nervensystems steht aktuell im Fokus der Forschung (Huang et al., 2012; Wang et al., 2015; Ozpur et al., 2016; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Stammzellen sind Körperzellen, die zur undifferenzierten Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Zelltypen fähig sind. Adulte Stammzellen können sich in bestimmte spezialisierte Zelltypen differenzieren.

In fast allen mesenchymalen, differenzierten Gewebearten finden sich adulte mesenchymale Stammzellen (Pittenger et al., 1999). Multipotente Vorläuferzellen aus Fettgewebe, sogenannten adipose-derived stem/progenitor cells (ADSPCs) sind eine Untergruppe, die jüngst in den Fokus der Forschung zellbasierter therapeutischer Ansätze zur Verbesserung peripherer Nervenregeneration gerückt ist (di Summa et al., 2010; Georgiou et al., 2015; Sowa et al., 2016; Shimizu et al., 2018). Gründe hierfür sind eine hohe Verfügbarkeit von Fettgewebe, geringe traumatische Asservierung mittels minimal invasiver Zugänglichkeit, zuverlässige Isolier-, Kultivier- und Transplantierbarkeit bei ausgeprägtem Differenzierungspotenzial und relativ hohem Stammzellertrag pro prozessierter Gewebemasse (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002; Lindroos et al., 2011; Faroni et al., 2013). Insbesondere im Vergleich zu Schwann-Zellen, einem Gliazelltyps des peripheren Nervensystems mit zentraler Bedeutung im Regenerationsprozess, findet sich eine deutliche Überlegenheit der Fettvorläuferzellen hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit, klinischen Anwendbarkeit und Kultivierung, bei gleichzeitigem vielversprechendem regenerativem Potenzial (Frostick et al., 1998; Madduri and Gander, 2010; Faroni et al., 2013).

Hauptsächlich die parakrine Ausschüttung von neuroprotektiven, -regenerativen und angiogenen Faktoren wie BDNF, NGF, NT-3, GDNF und Vascular endothelial growth factor (VEGF) als auch die potenzielle (Trans-)Differenzierung der ADSPCs zu neuronalen Gewebetypen, werden als begünstigende Mechanismen für

die periphere Nervenregeneration diskutiert (Kingham et al., 2007; Erba et al., 2010; Sowa et al., 2012; Faroni et al., 2013). Der Wirkung von Wachstumsfaktoren wird hinsichtlich der peripheren Nervenregeneration eine größere Bedeutung als der potenziellen Differenzierung der ADSPCs beigemessen (Faroni et al., 2013).

3.4 Die Bedeutung präkonditionierender Maßnahmen für ADSPCs

Wie im vorangehenden Abschnitt erläutert, konnten experimentell Erkenntnisse darüber gewonnen werden, dass multipotente Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe (ADSPCs) die periphere Nervenregeneration fördern können (di Summa et al., 2010; Reichenberger et al., 2016; Sowa et al., 2016; Masgutov et al., 2019). Es gilt Methoden zu entwickeln, um das Maximum des regenerativen Potenzials der ADSPCs für die periphere Nervenregeneration auszuschöpfen. Bekannt ist, dass mesenchymale Vorläuferzellen in ihrer therapeutischen Fähigkeit durch verschiedene Techniken des Präkonditionierens beeinflusst werden können (Ferreira et al., 2018). Die Behandlung mesenchymaler Vorläuferzellen mit pharmazeutischen Wirkstoffen, Wachstumsfaktoren, Hormonen oder dreidimensionale Kultivierung sind Beispiele solcher Methoden (Yang et al., 2015). Die Kultivierung mesenchymaler Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen ist als weitere effektive Technik zur Begünstigung regenerativer und zytoprotektiver Wirkung beschrieben (Ejtehadifar et al., 2015). Im Kontext von Zellkultur wird eine Sauerstoffkonzentration von 1 - 10 % als Hypoxie gewertet (Ivanovic, 2009; Eliasson and Jonsson, 2010; Ejtehadifar et al., 2015). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass Hypoxie bei mesenchymalen Vorläuferzellen eine Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1-alpha) hervorruft (Kiani et al., 2013). Dies wiederum führt mittels verstärkter Vaskularisierung infolge von erhöhten VEGF- und Angiogenin-Konzentrationen zur Förderung der Durchblutung und so potenziell zur Begünstigung regenerativer Prozesse (Ahluwalia and Tarnawski, 2012). Ebenso bewirkt die Kultivierung mesenchymaler Vorläuferzellen unter Hypoxie einen Anstieg zytoprotektiver Stoffe. Dies birgt Überlebensvorteile der Zellen am Wirkungsort (Lan et al., 2015). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass höhere Konzentrationsspiegel von Neurotrophinen wie BDNF oder GDNF erzielt werden können, was positiven Einfluss auf die axonale Aussprossung hat (Wood et al., 2013; McGregor and English, 2019). Unter hypoxischen Bedingungen scheinen ADSPCs eine höhere metabolische Aktivität, Expansion, Differenzierung und Effizienz der koloniebildenden Einheit zu erreichen als unter normoxischen Bedingungen (Saller et al., 2012; Krug et al., 2016).

Zusammenfassend fördert die Simulation des physiologischen Sauerstoffgehalts im Gewebe durch die hypoxische Kultivierung der ADSPCs, das regenerative Potenzial und die Stammzeleigenschaften der mesenchymalen Vorläuferzellen (Ivanovic, 2009; Choi et al., 2014).

Im Einklang mit diesen Erkenntnissen, stellte die Integration der hypoxischen Kultivierung der ADSPCs im vorliegenden Studiendesign/Versuchsaufbau ein zentrales Element dar. Um die Signifikanz, der durch hypoxische Kultivierung induzierten potenziellen Vorteile auf die periphere Nervenregeneration zu überprüfen, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studien die Kultivierung der ADSPCs unter Hypoxie (2 % O₂ über 72 h). Eine Vergleichsgruppe erhielt hingegen normoxisch kultivierte Zellen (21 % O₂ über 72 h).

3.5 Fibrinkleber als Trägermedium für ADSPCs in der peripheren Nervenregeneration

Neben der optimierten Modulation der regenerativen Zellen (siehe 3.4), ist die zuverlässige Bereitstellung und Potenzialentfaltung am gewünschten Wirkungs-ort – nämlich im Bereich der Nervenläsion – von essenzieller Bedeutung.

Im Rahmen zellbasierter Therapien werden diverse (Bio-)Materialien als potenzielle Zellträger untersucht. Angestrebtes Ziel ist stets die regenerativen Zellen ohne Verlust durch Dislokation und gleichzeitig möglichst ohne Beeinträchtigung ihrer Funktion verfügbar zu machen. Das Trägermedium sollte Biokompatibilität, -degradation aufweisen und auch Zellproliferation, -adhäsion und ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen gewährleisten (Kim et al., 2000; Mol et al., 2005).

Sowohl synthetische (aus Komponenten wie Metall, Keramik, Polyethylenglycol, oder Polylactid) als auch biologisch natürliche (zumeist aus protein- oder polysaccharidhaltigen Komponenten wie Alginate, Fibrin, Hyaluronsäure, Kollagen) Biomaterialien finden im Tissue Engineering Anwendung (Mano et al., 2007; Chan and Leong, 2008; Krug et al., 2019). Vorteile biologisch natürlicher Komponenten sind unter anderem schwächere bis inapparente/-existente immunologische Reaktionen am Empfängerort (Anderson et al., 2008; Klopffleisch and Jung, 2017).

Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit diente ein Zwei-Komponenten Fibrinkleber (ARTISS[®], Baxter, Deerfield, IL, USA), gewonnen aus humanem Plasma, als Trägermedium der ADSPCs in Form einer Nervenhülle. Es handelt sich um ein klinisch zugelassenes Arzneimittel, das unter anderem in der rekonstruktiv-plastischen Chirurgie und Verbrennungschirurgie als Gewebekleber Anwendung findet (Toman et al., 2007; Spotnitz, 2010; Lee et al., 2012). Krug et al. konnten jüngst zeigen, dass genannter Fibrinkleber *in vitro* eine gleichmäßige ADSPCs-Verteilung innerhalb der Fibrinmatrix, hohes Zellüberleben bei metabolischer und migrierender Aktivität als auch ausgeprägte Biokompatibilität und -degradation gewährleistet (Krug et al., 2019).

Die Verwendung von Fibrinkleber im Kontext der Behandlung peripherer Nervenverletzungen wird hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen als unproblematisch gewertet und zudem als förderliche Maßnahme für die Axonaussprossung diskutiert (Sameem et al., 2011; Longo et al., 2016).

Neben den in Abschnitt 3.4 beschriebenen experimentellen Gruppen mit zellbestückten Fibrinhülsen, sah das Studiendesign zur Abgrenzung des potenziellen Effekts durch additive Zellen eine separate Gruppe vor, die eine unbestückte Fibrinhülse als Ergänzung zur Behandlungstechnik des autologen Nerventransplantats erhielt.

3.6 Zielsetzungen und Eigenanteil der Veröffentlichungen

In der ersten Veröffentlichung beschäftigten wir uns mit der Validität und Durchführbarkeit eines tierexperimentellen Modells zur Überprüfung des Nutzens zellbestückter Fibrinhülsen für die periphere Nervenregeneration (Saller et al., 2018). Ziel war es, ein geeignetes Modell zur Evaluation der Wirkung verschiedener Zellen bzw. unterschiedlich präkonditionierter Zellen, jeweils eingebettet in Fibrinkleber, auf die periphere Nervenregeneration zu untersuchen/entwickeln. Dabei war eine Anforderung an das Modell, dass es möglichst nah am klinischen Behandlungsstandard liegt und somit potentiell in den klinischen Alltag übertragbar ist. Anhand einer kleineren Fallzahl ($n = 10$ gleichmäßig verteilt auf zwei Gruppen: autologes Nerventransplantat + zellbestückte Fibrinhülse vs. alleiniges autologes Nerventransplantat) wurde geprüft, ob die operativen Schritte, die Isolierung, Kultivierung, Zell-Charakterisierung sowie die Einbettung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Fibrinkleber, das Design und die Herstellung der Fibrinhülse, die Einbringung dieser in das Versuchstier und die Nachuntersuchung zuverlässig und praktikabel sind. Präkonditionierende Maßnahmen der autolog transplantierten Zellen erfolgten nicht.

Folgende Punkte beschreiben den Eigenanteil der ersten Veröffentlichung: detaillierte Literaturrecherche, Mitgestaltung der Versuchsvorbereitung und des Versuchsaufbaus, Design und Herstellung der Fibrinhülse, Versuchstierbetreuung während des gesamten *in-vivo* Versuchs, Assistenz bei den Tieroperationen, Isolierung und Kultivierung der ADSPCs, Durchführung aller Experimente zur funktionellen Datenerhebung, Gewinnung der Muskel- und Nervenpräparate zur histomorphologischen Nachuntersuchung, gemeinsame Analyse und Interpretation der Versuchsergebnisse mit den Co-Autoren der Studie, Mitgestaltung der Abbildungen und Graphen. Ich verfasste anteilig den Material- und Methoden-Teil des Manuskripts. Korrekturlesen des Manuskripts, Mitverfassen der Revision.

In der zweiten Veröffentlichung beschäftigten wir uns mit der peripheren Nervenregeneration nach chirurgischer Intervention mittels autologem Nerveninterponat bei Kontinuitätsdefekten kritischer Länge. Die führende Fragestellung bestand

darin, ob dieses therapeutische Regime von einer zusätzlichen Ummantelung des autologen Transplantats mit einer Nervenhülle, welche mit hypoxisch präkonditionierten autologen Fettvorläuferzellen (ADSPCs) bestückt ist, profitiere. Explizit ging es somit um eine Ergänzung der aktuellen Behandlungstechnik der Wahl und nicht um eine potenzielle Ersatztechnik. Hierbei waren der primäre Endpunkt die funktionelle Nachuntersuchung mittels sciatic function index (SFI) bzw. static sciatic index (SSI) und sekundäre Endpunkte die Atrophie von Zielmuskulatur, morphometrische als auch quantitativ histologische Analyseparameter. Eine weitere zentrale Fragestellung war, ob sich die Ergebnisse zwischen normoxisch und hypoxisch kultivierten Fettvorläuferzellen (ADSPCs) unterscheiden (Mayer et al., 2023).

Folgende Punkte beschreiben den Eigenanteil der zweiten Veröffentlichung: detaillierte Literaturrecherche, Mitgestaltung der Versuchsvorbereitung, Design und Herstellung der Fibrinhülle, Versuchstierbetreuung während des gesamten *in-vivo* Versuchs, Assistenz bei den Tieroperationen, Isolierung und Kultivierung der ADSPCs, Durchführung aller Experimente zur funktionellen Datenerhebung, Gewinnung der Muskel- und Nervenpräparate zur histomorphologischen Nachuntersuchung, Analyse und Interpretation der Versuchsergebnisse mit den Co-Autoren der Studie, Gestaltung der Abbildungen und Graphen mit Dr. rer. nat. Saller. Das Manuskript wurde von mir vollständig erstverfasst und anschließend durch Herrn Priv.-Dozent Dr. med. Holzbach, Priv.-Dozent Dr. med. Volkmer, Dr. rer. nat. Saller und Herrn Dr. med. Krug revidiert und von mir in seine finale Fassung gebracht. Verfassen der Revision. Der graphical abstract der Veröffentlichung wurde vollständig von mir erstellt. Die geteilte Erstautorenschaft von Herrn Dr. med. Krug und meiner Person begründet sich in einem vergleichbar hohen Beitrag zur Studie.

4 Zusammenfassung

4.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Schwerwiegende Traumata können mit Verletzungen des peripheren Nervensystems einhergehen (Robinson, 2000). Insuffiziente axonale Regeneration nach peripheren Nervenverletzungen und der damit verbundene Funktionsverlust können die Lebensqualität der Patienten und Patientinnen nachhaltig mindern (Meiners et al., 2005). Im Falle einer Durchtrennung (Sunderland Grad IV und V) eines peripheren Nervens bedarf es einer operativen Rekonstruktion um eine adäquate Nervenregeneration zu ermöglichen (Mackinnon, 2015). Liegt ein Nervensubstanzdefekt kritischer Länge vor, der eine primäre End-zu-End-Koaptation nicht zulässt, so ist das autologe Nerventransplantat zur Wiederherstellung der Kontinuität das therapeutische Mittel der Wahl (Lee and Wolfe, 2000). Multipotente Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe, sogenannten adipose-derived stem progenitor cells (ADSPCs) sind in jüngster Zeit in den Fokus der Erforschung zellbasierter, therapeutischer Ansätze zur Verbesserung peripherer Nervenregeneration gerückt (di Summa et al., 2010; Georgiou et al., 2015; Sowa et al., 2016; Walocko et al., 2016; Shimizu et al., 2018). Das Ziel unserer ersten Studie war es daher, ein geeignetes Modell zur Evaluation der Wirkung unterschiedlicher Zellen bzw. unterschiedlich präkonditionierter Zellen, jeweils eingebettet in Fibrinkleber, auf die periphere Nervenregeneration zu entwickeln (Saller et al., 2018).

Die Isolation der ADSPCs aus dem inguinalen Fettgewebe von Sprague-Dawley Versuchsratten erfolgte nach operativer Resektion durch enzymatische Prozessierung mittels eines klinisch zugelassenen Aufbereitungssystems. Die Zellen wurden über 72 Stunden expandiert. Zur Überprüfung der Machbarkeit des vorgesehenen Modells wurde eine Hülse (25 mm Länge, 2 mm Wanddicke und 2 mm Innendurchmesser) aus Fibrinkleber (ARTISS®, Baxter, USA), das mit 3×10^6 autologen undifferenzierten ADSPCs bestückt wurde, hergestellt. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde diese Hülse unmittelbar im operativen Vorgehen eingesetzt. Um einen Nervendefekt kritischer Länge zu induzieren, erfolgte die Resektion eines 20 mm langen Segments des Nervus ischiadicus des rechten Hin-

terlaufs und unmittelbar anschließend die inverse Positionierung und mikrochirurgische Koaptation in die Kontinuitätslücke. Dieses Vorgehen imitierte die operative Technik des autologen Nerven­transplantats. Anschließend wurde das Nerveninterponat inklusive seiner proximalen und distalen Koaptationsstellen mit der zellbestückten Hülse ummantelt. Die funktionelle Regeneration wurde postoperativ über 16 Wochen mittels Lauf­tests (SFI) und statischen Fotoanalysen (SSI) ermittelt. Post mortem erfolgten Messungen der Muskelatrophie und histomorphologische Untersuchungen der Nerven. Es konnte gezeigt werden, dass sich das verwendete Modell zur Erforschung zellvermittelter Effekte auf die periphere Nervenregeneration eignet. Ebenso zeigten sich positive Effekte im Sinne funktionell motorischer Vorteile auf die Nervenregeneration durch die supplementäre Maßnahme der zellbestückten Fibrinhülse nach Behandlung mittels autologer Nerven­transplantation (Saller et al., 2018).

Die Kultivierung mesenchymaler Vorläuferzellen unter hypoxischen Bedingungen wird neben weiteren Präkonditionierungstechniken als förderndes Mittel für die Ausschöpfung des regenerativen Potenzials der Zellen auf die periphere Nervenregeneration gewertet (Ejtehadifar et al., 2015).

Die zugrundeliegende Hypothese unserer zweiten Studie war, dass das therapeutische Regime der autologen Nerven­transplantation durch eine zusätzliche Ummantelung mit einer Fibrinhülse, die mit hypoxisch präkonditionierten ADSPCs bestückt ist, signifikant profitiere. Oben beschriebenes experimentelles Vorgehen diene dabei als Modell zur Untersuchung der Hypothese. Das Studiendesign beinhaltete drei unterschiedliche Gruppen, deren Versuchstiere verschiedene therapeutische Maßnahmen zusätzlich zum autologen Nerven­transplantat erhielten (Fibrinhülse mit hypoxisch präkonditionierten ADSPCs vs. Fibrinhülse mit normoxisch kultivierten ADSPCs vs. zellfreie Fibrinhülse) (Mayer et al., 2023).

Es zeigte sich bei den Versuchstieren eine beschleunigte funktionelle Regeneration durch hypoxische Präkonditionierung der ADSPCs im Vergleich zur Verwendung von zelllosen Fibrinhülsen oder solchen mit normoxisch kultivierten ADSPCs. Anatomische Parameter wie die Remyelinisierung, der Axondurchmesser, Axonaussprossung/-dichte konnten durch zellbestückte Fibrinhülsen im Vergleich zu zelllosen Hülsen gefördert werden. Ebenso reduzierte hypoxische

Präkonditionierung der ADSPCs die Atrophie von Zielmuskulatur verglichen zu Kultivierung unter normoxischen Bedingungen, wenn gleich in nicht signifikantem Ausmaß. Obgleich der supplementäre Einsatz hypoxisch vorbehandelter ADSPCs die periphere Nervenregeneration nach autologer Nerven transplantation zu verbessern scheint, konnten die vollständige physiologische Funktion des Zielorgans und das histologische Erscheinungsbild eines unbeeinträchtigten Nerven innerhalb des Untersuchungszeitraums von 16 Wochen nicht wiederhergestellt werden. Es gilt zukünftig die zugrundeliegenden Mechanismen, die eine Förderung der Regeneration durch ADSPC bestückte Fibrinhülsen bewirken, weiter zu untersuchen, um eine Anwendungsmöglichkeit im klinischen Alltag erreichen zu können (Mayer et al., 2023).

4.2 Zusammenfassung in englischer Sprache

Severe trauma can cause acute peripheral nerve injuries. Despite inherent regenerative abilities of peripheral nerves and ongoing progress in therapeutic treatment, major peripheral nerve injuries of critical size reflect immense risks for insufficient neuro-muscular restoration. Incomplete axonal peripheral regeneration and the associated loss of function can significantly affect quality of life (Meiners et al., 2005). In case of transection of peripheral nerves, surgical reconstruction is required to obtain neural recovery (Mackinnon, 2015). To reestablish critical size peripheral nerve discontinuities autografting nerves remains the clinical standard to promote axonal regeneration aiming to regain motor and sensory function (Kuffler and Foy, 2020). Recent data underline the supportive effect of ADSPCs in peripheral nerve restoration (di Summa et al., 2010; Georgiou et al., 2015; Sowa et al., 2016; Shimizu et al., 2018). The aim of the first study was to develop a feasible and suitable animal model which allows to examine the effect of various cell based therapy strategies including preconditioning techniques, which might be beneficial to peripheral nerve recovery in vivo (Saller et al., 2018).

To isolate ADSPCs, inguinal fat pads of Sprague-Dawley rats were resected bilaterally, enzymatically processed with a clinically approved centrifuge and cultivated for expansion for 72 hours (Saller et al., 2018). To validate the feasibility of the model, a polymerizing fibrin (ARTISS[®], Baxter, USA) conduit (25 mm long, 2 mm wall thickness and 2 mm inner diameter) containing 3×10^6 of the autologous undifferentiated ADSPCs was fabricated and directly used for the operation procedure. To induce an artificial nerve defect of critical size, a 20 mm segment of the sciatic nerve was resected and reverse positioned into the neural gap to imitate the repair of the interruption by autologous nerve transplantation. Following nerve coaptation, the prepared fibrin conduit was placed around the sutured nerve replacement in order to cover the entire 20 mm long segment and both coaptation sides completely. A 16-week long continuous postoperative follow-up was conducted before sacrificing the animals for muscle mass analyses and histomorphological nerve assessment. In conclusion, the applied model revealed to be a powerful tool to investigate cell mediated effects on peripheral nerve recov-

ery (Saller et al., 2018). The addition of a cell carrying conduit resulted in improved functional recovery and anatomical parameters in comparison to sole autografting.

Amongst other techniques, cultivation in hypoxic condition is considered to enhance the release of the regenerative potential of stem cells (Ejtehadifar et al., 2015). The purpose of the second present study was to examine whether rat's peripheral nerve regeneration after surgical repair with nerve autografting technique benefits from an additional fibrin conduit, which is seeded with ADSPCs cultivated under hypoxia. This treatment mode was compared with three others: fibrin conduit seeded with ADSPCs cultivated under normoxic conditions; non-cell-carrying conduit; and nerve autograft only (Mayer et al., 2023). The previously elaborated model (as described above) served as suitable testing tool.

Hypoxic preconditioning of ADSPCs significantly accelerated the functional neural recovery of the rats in comparison to rats that received a non-cell or normoxic cultivated ADSPCs carrying conduit. Furthermore, treatment with cell carrying conduits improved remyelination, axon diameter as well as axon out-growth/branching when compared to animals without a cell carrying conduit. The addition of hypoxic pretreated ADSPCs slightly reduced muscle mass loss in comparison to normoxic cultivated ADSPCs carrying conduits. But these results did not reveal to be significant. Though adding hypoxic pretreated ADSPCs embedded in a fibrin conduit seemed to be beneficial within the framework of this study, physiological function and anatomical appearance were not restored within 16 weeks after operation. Further studies are crucial to understand the underlying mechanisms of how ADSPCs in fibrin matrix are able to promote peripheral nerve regeneration after autologous nerve grafting aiming to elaborate proper techniques to transfer the benefits to clinical routine.

5 Veröffentlichung I

Maximilian M. Saller, Rosa-Eva Huettl, **Julius M. Mayer**, Annette Feuchtinger, Christian Krug, Thomas Holzbach, Elias Volkmer.

Validation of a novel animal model for sciatic nerve repair with an adipose-derived stem cell loaded fibrin conduit.

Neural Regeneration Research. Mai 2018. 13(5):854-861.

doi: 10.4103/1673-5374.232481

Es handelt sich um eine Originalarbeit. Die Arbeit unterlag einem Review-Verfahren. Der Impact-Faktor des Journals (Neural Regeneration Research) lag im Jahr 2018 bei 2,472 (Quelle: Clarivate Journal Citation Reports (Stand 02.07.2022)).

6 Veröffentlichung II

Julius M. Mayer*, Christian Krug*, Maximilian M. Saller, Annette Feuchtinger, Riccardo E. Giunta, Elias Volkmer*, Thomas Holzbach*.

Hypoxic pre-conditioned adipose-derived stem/progenitor cells embedded in fibrin conduits promote peripheral nerve regeneration in a sciatic nerve graft model.

Neural Regeneration Research. März 2023.18(3):652-656.

doi: 10.4103/1673-5374.346464

*geteilte Erst-/Letztautorenschaft

Es handelt sich um eine Originalarbeit. Die Arbeit unterlag einem Review-Verfahren. Der Impact-Faktor des Journals (Neural Regeneration Research) lag im Jahr 2021 bei 6,058 (Quelle: Clarivate Journal Citation Reports (Stand 02.07.2022)).

7 Literaturverzeichnis

- Ahluwalia A, Tarnawski AS (2012) Critical role of hypoxia sensor--HIF-1alpha in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem* 19:90-97.
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20:86-100.
- Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J (2017) *Duale Reihe Anatomie: Thieme.*
- Bingham JR, Kniery KR, Jorstad NL, Horkayne-Szakaly I, Hoffer ZS, Salgar SK (2019) "Stem cell therapy to promote limb function recovery in peripheral nerve damage in a rat model" - Experimental research. *Ann Med Surg (Lond)* 41:20-28.
- Braga Silva J, Marchese GM, Cauduro CG, Debiase M (2017) Nerve conduits for treating peripheral nerve injuries: A systematic literature review. *Hand Surg Rehabil* 36:71-85.
- Brooks DN, Weber RV, Chao JD, Rinker BD, Zoldos J, Robichaux MR, Ruggeri SB, Anderson KA, Bonatz EE, Wisotsky SM, Cho MS, Wilson C, Cooper EO, Ingari JV, Safa B, Parrett BM, Buncke GM (2012) Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: a multicenter study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions. *Microsurgery* 32:1-14.
- Campbell WW (2008) Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* 119:1951-1965.
- Chan BP, Leong KW (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 17 Suppl 4:467-479.
- Choi JR, Pinguang-Murphy B, Wan Abas WA, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Wan Safwani WK (2014) Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 448:218-224.
- Chung K (2019) *Grabb and Smith's Plastic Surgery: Wolters Kluwer Health.*

- Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A (2012) A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface* 9:202-221.
- Deller T, Welsch U, Kummer W (2018) *Histologie - Das Lehrbuch*: Elsevier Health Sciences.
- di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF (2010) Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63:1544-1552.
- Diao E, Vannuyen T (2000) Techniques for primary nerve repair. *Hand Clin* 16:53-66, viii.
- Dornseifer U, Fichter AM, Leichtle S, Wilson A, Rupp A, Rodenacker K, Ninkovic M, Biemer E, Machens HG, Matiasek K, Papadopulos NA (2011) Peripheral nerve reconstruction with collagen tubes filled with denatured autologous muscle tissue in the rat model. *Microsurgery* 31:632-641.
- Ejtehadifar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Akbarzadehlaleh P, Dehdilani N, Abbasi P, Molaeipour Z, Saleh M (2015) The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Adv Pharm Bull* 5:141-149.
- Eliasson P, Jonsson JI (2010) The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 222:17-22.
- Erba P, Mantovani C, Kalbermatten DF, Pierer G, Terenghi G, Kingham PJ (2010) Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63:e811-817.
- Faroni A, Terenghi G, Reid AJ (2013) Adipose-derived stem cells and nerve regeneration: promises and pitfalls. *International review of neurobiology* 108:121-136.
- Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Goncalves RM (2018) Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol* 9:2837.
- Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ (1998) Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18:397-405.

- Georgiou M, Golding JP, Loughlin AJ, Kingham PJ, Phillips JB (2015) Engineered neural tissue with aligned, differentiated adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration across a critical sized defect in rat sciatic nerve. *Biomaterials* 37:242-251.
- Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG (2003) Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 8:236-250.
- Hoke A, Redett R, Hameed H, Jari R, Zhou C, Li ZB, Griffin JW, Brushart TM (2006) Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *J Neurosci* 26:9646-9655.
- Huang SP, Hsu CC, Chang SC, Wang CH, Deng SC, Dai NT, Chen TM, Chan JY, Chen SG, Huang SM (2012) Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect. *Ann Plast Surg* 69:656-662.
- Ivanovic Z (2009) Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol* 219:271-275.
- Kiani AA, Kazemi A, Halabian R, Mohammadipour M, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH (2013) HIF-1alpha confers resistance to induced stress in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 44:185-193.
- Kim BS, Baez CE, Atala A (2000) Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* 18:2-9.
- Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G (2007) Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 207:267-274.
- Klopfleisch R, Jung F (2017) The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 105:927-940.
- Krug C, Holzbach T, Giunta RE (2015) Periphere Nervenverletzungen. *Handchir Scan* 04:57-69.

- Krug C, Beer A, Saller MM, Aszodi A, Holzbach T, Giunta RE, Volkmer E (2016) [Isolation and Characterization of Multipotent Precursor Cells from Murine Adipose Tissue using a Clinically Approved Cell Separation System]. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe* 48:87-94.
- Krug C, Beer A, Hartmann B, Prein C, Clause-Schaumann H, Holzbach T, Aszodi A, Giunta RE, Saller MM, Volkmer E (2019) Fibrin glue displays promising in vitro characteristics as a potential carrier of adipose progenitor cells for tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 13:359-368.
- Kuffler DP, Foy C (2020) Restoration of Neurological Function Following Peripheral Nerve Trauma. *Int J Mol Sci* 21.
- Lan YW, Choo KB, Chen CM, Hung TH, Chen YB, Hsieh CH, Kuo HP, Chong KY (2015) Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther* 6:97.
- Lee JC, Teitelbaum J, Shajan JK, Naram A, Chao J (2012) The effect of fibrin sealant on the prevention of seroma formation after postbariatric abdominoplasty. *Can J Plast Surg* 20:178-180.
- Lee SK, Wolfe SW (2000) Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* 8:243-252.
- Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S (2011) The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep* 7:269-291.
- Longo MV, Marques de Faria JC, Isaac C, Nepomuceno AC, Teixeira NH, Gemperli R (2016) Comparisons of the results of peripheral nerve defect repair with fibrin conduit and autologous nerve graft: An experimental study in rats. *Microsurgery* 36:59-65.
- Lundborg G (1988) *Nerve Injury and Repair*: Churchill Livingstone.
- Mackinnon SE (2015) *Nerve Surgery*: Thieme.
- Mackinnon SE, Dellon AL (1988) *Surgery of the Peripheral Nerve*: Thieme Medical Publishers.
- Madduri S, Gander B (2010) Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 15:93-103.

- Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NM, Reis RL (2007) Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface* 4:999-1030.
- Masgutov R, Masgutova G, Mullakhmetova A, Zhuravleva M, Shulman A, Rogozhin A, Syromiatnikova V, Andreeva D, Zeinalova A, Idrisova K, Allegrucci C, Kiyasov A, Rizvanov A (2019) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Applied in Fibrin Glue Stimulate Peripheral Nerve Regeneration. *Front Med (Lausanne)* 6:68.
- Mayer JM, Krug C, Saller MM, Feuchtinger A, Giunta RE, Volkmer E, Holzbach T (2023) Hypoxic pre-conditioned adipose-derived stem/progenitor cells embedded in fibrin conduits promote peripheral nerve regeneration in a sciatic nerve graft model. *Neural Regen Res* 18.
- McGregor CE, English AW (2019) The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12.
- Meiners PM, Coert JH, Robinson PH, Meek MF (2005) Impairment and employment issues after nerve repair in the hand and forearm. *Disabil Rehabil* 27:617-623.
- Midha R, Grochmal J (2019) Surgery for nerve injury: current and future perspectives. *J Neurosurg* 130:675-685.
- Mol A, van Lieshout MI, Dam-de Veen CG, Neuenschwander S, Hoerstrup SP, Baaijens FP, Bouten CV (2005) Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials* 26:3113-3121.
- Ozpur MA, Guneren E, Canter HI, Karaaltin MV, Ovali E, Yogun FN, Baygol EG, Kaplan S (2016) Generation of Skin Tissue Using Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Plast Reconstr Surg* 137:134-143.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Raza C, Riaz HA, Anjum R, Shakeel NUA (2020) Repair strategies for injured peripheral nerve: Review. *Life Sci* 243:117308.

- Reichenberger MA, Mueller W, Hartmann J, Diehm Y, Lass U, Koellensperger E, Leimer U, Germann G, Fischer S (2016) ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineural suturing in a rat model. *Microsurgery* 36:491-500.
- Robinson LR (2000) Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve* 23:863-873.
- Saller MM, Huettl RE, Mayer JM, Feuchtinger A, Krug C, Holzbach T, Volkmer E (2018) Validation of a novel animal model for sciatic nerve repair with an adipose-derived stem cell loaded fibrin conduit. *Neural Regen Res* 13:854-861.
- Saller MM, Prall WC, Docheva D, Schonitzer V, Popov T, Anz D, Clausen-Schaumann H, Mutschler W, Volkmer E, Schieker M, Polzer H (2012) Increased stemness and migration of human mesenchymal stem cells in hypoxia is associated with altered integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 423:379-385.
- Sameem M, Wood TJ, Bain JR (2011) A systematic review on the use of fibrin glue for peripheral nerve repair. *Plast Reconstr Surg* 127:2381-2390.
- Seddon HJ (1943) THREE TYPES OF NERVE INJURY. *Brain* 66:237-288.
- Shimizu M, Matsumine H, Osaki H, Ueta Y, Tsunoda S, Kamei W, Hashimoto K, Niimi Y, Watanabe Y, Miyata M, Sakurai H (2018) Adipose-derived stem cells and the stromal vascular fraction in polyglycolic acid-collagen nerve conduits promote rat facial nerve regeneration. *Wound Repair Regen* 26:446-455.
- Sowa Y, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Fushiki S (2012) Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells Dev* 21:1852-1862.
- Sowa Y, Kishida T, Imura T, Numajiri T, Nishino K, Tabata Y, Mazda O (2016) Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. *Plast Reconstr Surg* 137:318e-330e.
- Spotnitz WD (2010) Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. *World J Surg* 34:632-634.

- Sulaiman OA, Gordon T (2009) Role of chronic Schwann cell denervation in poor functional recovery after nerve injuries and experimental strategies to combat it. *Neurosurgery* 65:A105-114.
- Sunderland S (1951) A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74:491-516.
- Terenghi G (1999) Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 194 (Pt 1):1-14.
- Toman N, Buschmann A, Muehlberger T (2007) [Fibrin glue and seroma formation following abdominoplasty]. *Chirurg* 78:531-535.
- Walocko FM, Khouri RK, Jr., Urbanchek MG, Levi B, Cederna PS (2016) The potential roles for adipose tissue in peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 36:81-88.
- Wang D, Wang Y, Tian W, Pan J (2019) Advances of tooth-derived stem cells in neural diseases treatments and nerve tissue regeneration. *Cell Prolif* 52:e12572.
- Wang X, Zhang J, Zhang F, Li J, Li Y, Tan Z, Hu J, Qi Y, Li Q, Yan B (2015) The Clinical Status of Stem Cell Therapy for Ischemic Cardiomyopathy. *Stem Cells Int* 2015:135023.
- Wood MD, Gordon T, Kim H, Szykaruk M, Phua P, Lafontaine C, Kemp SW, Shoichet MS, Borschel GH (2013) Fibrin gels containing GDNF microspheres increase axonal regeneration after delayed peripheral nerve repair. *Regen Med* 8:27-37.
- Wüstner-Hofmann M (2013) AWMF –Register Nr. 005/010 S3 Leitlinie Versorgung peripherer Nervenläsionen, Stand 3/16 S:1–97.
- Yang J, Gao F, Zhang Y, Liu Y, Zhang D (2015) Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) Enhances Angiogenic Effect of Mesenchymal Stem Cell by Upregulating VEGF Expression After Focal Cerebral Ischemia. *J Mol Neurosci* 56:898-906.
- Zhang R, Ma J, Han J, Zhang W, Ma J (2019) Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. *Am J Transl Res* 11:6275-6289.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-228.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295.

8 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Thomas Holzbach für die Überlassung des Themas, die sehr persönliche Betreuung und ständige Unterstützung bei der Erstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit. Er ermöglichte mir nicht nur die Anfertigung der vorliegenden Arbeit, sondern er weckte eine nachhaltige Begeisterung für die Plastische Chirurgie in mir.

Herrn Prof. Dr. med. Riccardo Giunta danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Christian Krug, der mir als Mentor stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. Maximilian Saller und Frau Dr. Annette Feuchtinger danke ich ebenfalls für die intensive Unterstützung, Anleitung und das Teilen ihres Fachwissens.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern, Schwestern, meinem Onkel und Vittoria für die liebevolle Ermutigung und geduldige Unterstützung bis zum Vollenden dieser Arbeit bedanken.