

**Mikrobiologische und pathologische Analyse
explantierter unterschiedlich kryokonservierter
Schädelkalotten nach dekompressiver
Hemikraniektomie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Rachit Agrawal

aus Sunsari, Nepal

2024

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. Konstantinos Gousias

2. Gutachterin: Prof. Dr. Marieta Ioana Toma

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.06.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Vatter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1. Deutsche Zusammenfassung	8
1.1 Einleitung	8
1.2 Material und Methoden	11
1.2.1 Ziele der klinischen Studie	11
1.2.2 Materialsammlung und Lagerung	12
1.2.3 Mikrobiologische Analyse	13
1.2.4 Pathologische Analyse	14
1.3 Ergebnisse	15
1.3.1 Demografische Daten der Studienpopulation	15
1.3.2 Mikrobiologische Ergebnisse	16
1.3.3 Pathologische Ergebnisse	17
1.4 Diskussion	20
1.5 Zusammenfassung	25
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	26

2	Veröffentlichungen	31
3	Danksagung	46

Abkürzungsverzeichnis

ABF	Autologous Bone Flap
BRF	Bone regenerating factor
CAD	Computer-aided-Design
CFU	Colony forming unit
DH	Dekompressive Hemokraniektomie
HPF	High Power Field
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Time of flight mass spectrometry
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
OPG	Osteoprotegerin
PEEK	Polyetheretherketon
PTH1R	Parathyroid Hormone Type 1 Receptor
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor kB Ligand
SF	Synthetic Flap
sSHT	Schweres Schädelhirntrauma
TRAIL	Tumour necrosis factor–related apoptosis inducing ligand

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schädellappen explantiert nach DH, für Bakterienkulturen verwendet (Agrawal et al., 2022)	14
Abbildung 2: Typisches Bakterienwachstum nach Kontamination mit <i>S. aureus</i> (links), <i>S. epidermidis</i> (Mitte) und <i>C. acnes</i> (rechts) (Agrawal et al., 2022).....	17
Abbildung 3: H&E-Färbung, Normale Osteozyten (#), histologisches Zeichen einer Osteonekrose (leeren Osteozyten mit * markiert)(Gousias et al 2023).....	17
Abbildung 4: Immunohistochemische Färbung der Zellmembran für PTH1R (rot)(Gousias et al 2023).....	18

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demografische Daten der Studiengruppe (Agrawal et al 2022)	16
Tabelle 2a: Expressionsprofil von PTH1R und OPG sowie Knochenavitalität (Gousias et al 2023)	19
Tabelle 2b: Ergebnisse (Fixeffekte) des log-linearen gemischten Modells mit zufälligem Versatz (Gousias et al 2023)	20

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die dekompressive Hemokraniektomie (DH) beschreibt die Entfernung eines Teils der Schädelkalotte und wird in Situationen mit lebensbedrohlichem Hirndruck bzw. maligner Hirnschwellung eingesetzt. Dies erfolgt häufig im Zusammenhang mit einem schweren Schädelhirntrauma (sSHT) oder einem großen Hirninfarkt (Signorelli et al., 2022; Shepetovsky et al., 2021). Das Ziel einer DH liegt grundsätzlich in einer Entlastung des Hirndrucks und der Verhinderung eines Einklemmens des Hirnstamms (Alkhaibary et al., 2020; Mee et al., 2022).

Nach durchgeführter DH besteht die Indikation für die operative Deckung des kranialen Defekts erst nach einigen Wochen bis Monaten unter der Voraussetzung, dass die Hirnschwellung vollständig rückgebildet ist. Bei der Prozedur kann entweder der eigene Schädeldeckel reimplantiert oder ein synthetischer Deckel verwendet werden (Alkhaibary et al., 2022; Mee et al., 2022). Letztere werden als Computer-aided-Design (CAD)-Implantate bezeichnet und mithilfe von computertomographischen Daten des Patienten als 3D-Rekonstruktion aus verschiedenen Materialien wie Titan oder Polyetheretherketon (PEEK) hergestellt.

Verschiedene Studien zeigen, dass die Kranioplastie, obwohl sie zu den technisch einfacheren neurochirurgischen Verfahren zählt, mit hohen Komplikationsraten assoziiert ist (Do et al., 2022; Gerstl et al., 2022; Honeybul und Ho, 2016; Mee et al., 2022; Shepetovsky et al., 2021; Signorelli et al., 2022). Zu den häufigen unerwünschten Ereignissen gehören Hirnblutungen, neue auftretende Krampfanfälle und oberflächliche Wundheilungsstörungen, aber auch spezifische Komplikationen wie die Infektion und Autolyse des autologen Kalottenimplantates. Die Komplikationsrate für Knocheninfektionen wird in Studien zwischen 7 und 22 % sowie für die Autolyse des Implantats mit 3 bis 51 % beziffert (Gerstl et al., 2022; Malcolm et al., 2018; Shepetovsky et al., 2021; Signorelli et al., 2022).

Es sind bereits verschiedene Faktoren bekannt, die mit einem höheren Risiko für postoperative Infektionen des Schädelsknochens oder zur Autolyse des Knochenimplantats verbunden sind. Zu diesen gehören ein geringeres Alter unter 30 Jahren, die Fragmentierung

der reimplantierten Schädelkalotten nach Kalottenfrakturen bei SHT, ein VP-Shunt-pflichtiger Hydrozephalus, mehrfache Schädeloperationen sowie eine lange Konservierung des explantierten Schädeldeckels (Brommeland et al., 2015; Do et al., 2022; Gerstl et al., 2022; Honeybul und Ho, 2016; Korhonen et al., 2018; Malcolm et al., 2018; Mee et al., 2022; Schwarz et al., 2016; Shepetovsky et al., 2021; Signorelli et al., 2022).

Darüber hinaus wird eine ursächliche Wirkung einer suboptimalen Kryokonservierung des Knochendeckes für postoperative Infektionen oder Osteolysen diskutiert. Bisher existieren keine Leitlinien oder Standardmethoden für die Aufbewahrung und den Umgang mit explantierten Schädelkalotten, beispielsweise zur optimalen Temperatur der Asservierung. Die Routine unserer klinischen Arbeit fußt derzeit auf einer Leitlinie der Gesellschaft für Unfallchirurgie, nach welcher die Lagerung von Knochenimplantaten/Knochenersatz bei weniger als -70°C empfohlen wird (Fölsch et al., 2015; Ramalingam et al., 2018; Tiefenboeck et al., 2020). Grundsätzlich werden in unterschiedlichen Kliniken jedoch Temperaturen zwischen -20°C und -196°C für die Kryokonservierung verwendet (Chan et al., 2017; Hng et al., 2015).

Für Aussagen zu den optimalen Lagerungstemperaturen und -dauern von explantierten Schädeldeckeln könnten entweder

- 1) prospektive randomisierte Fall-Kontroll-Studien mit Betrachtung von relevanten Patientenoutcomes und postoperativen Komplikationsraten oder
- 2) direkte laborparametrische (z. B. mikrobiologische, pathologische) Untersuchungen

herangezogen werden. Erstere sind jedoch mit erheblichen ethischen und auch organisatorischen Herausforderungen verbunden, sodass bisher keine klinischen Studien zur Fragestellung optimaler Lagerungsbedingungen existieren. Bis dato existieren lediglich wenige retrospektive Kohortenanalysen zu Komplikationsraten nach Kranioplastie, bei welchen unterschiedliche Lagerungstemperaturen von Schädelkalotten verglichen wurden (Gerstl et al., 2022; Honeybul und Ho, 2016; Malcolm et al., 2018; Mee et al., 2022; Shepetovsky et al., 2021; Signorelli et al. 2022). Ein statistischer Vergleich von Komplikationsraten unterschiedlicher Patientenkohorten ist jedoch aufgrund der Vielzahl möglicher statistischer Verzerrungen (z. B. aufgrund von unterschiedlichen Behandlungsprotokollen

bei Schlaganfall- oder SHT-Patienten; Unterschieden in den Institutionen und bei der Patientenauswahl) nur eingeschränkt sinnvoll. Robuste Schlussfolgerungen über die Überlegenheit einer Lagerungstemperatur ist basierend auf der aktuellen Studienlage daher nicht möglich.

Direkte laborparametrische Untersuchungen während der Konservierungszeit bieten hingegen datenbasierte Aussagen zum Einfluss der Lagerungstemperatur auf das Risiko von spezifischen postoperativen Komplikationen. Zudem erlaubt dieses Studiendesign bereits vor der Reimplantation die Untersuchung der Kalotte und damit den Ausschluss bzw. die Bestätigung einer Infektion oder von Zeichen einer Osteonekrose.

Bisher existieren nur einzelne laborparametrische Studien, die jedoch keinen Vergleich zwischen verschiedenen Konservierungsmethoden anstellen. Cho et al. (2017) führte eine Untersuchung an 47 explantierten Schädelkalotten durch, die bei -70°C für 9 bis 161 Monate kryokonserviert wurden. Die Autoren haben eine bakterielle sowie eine Osteoblasten-Kultur angelegt, konnten jedoch kein bakterielles Wachstum oder die Extraktion von Osteoblasten zeigen (Cho et al., 2017). In einer Studie mit ähnlichem Studiendesign führten Chan et al. (2017) bei explantierten Schädeldeckeln, die bei -80°C für 4 bis 55 Monate kryokonserviert wurden, ebenfalls Bakterien- und Osteoblasten-Kulturen durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass 5 der untersuchten Kalotten bakteriell infiziert waren (3 mit *Pasteurella multocida*, 2 mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA)). Osteoblasten konnten auch in dieser Studie in den Kulturen nicht nachgewiesen werden (Chan et al., 2017).

Die Sichtung vorhandener Studien zeigt eine Evidenzlücke bei Infektionsraten, dem Infektionspotenzial, dem Knochenmetabolismus und der Viabilität von explantierten Schädeldeckeln, die unter verschiedenen Lagerungsbedingungen in einer Institution konserviert wurden. Um dieser Evidenzlücke zu begegnen, haben wir unsere klinische Studie DRKS00023283 (<https://www.drks.de>) initiiert. Das Ziel dieser Studie lag in der Untersuchung des mikrobiologischen und pathologischen Profils von explantierten Schädeldeckeln, die bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (-23°C bei Gruppe A; -80°C bei Gruppe B) konserviert wurden.

1.2 Material und Methoden

Im Rahmen der klinischen Studie DRKS00023283 wurden explantierte Schädelkalotten von verstorbenen Patienten, bei welchen in der Neurochirurgischen Klinik Lünen eine DH zwischen Juni 2019 und Oktober 2020 durchgeführt wurde, untersucht. Die klinische Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Münster genehmigt (Ethikvotum: 2020-340-f-S). Diese Untersuchungen wurden gemäß der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

Im Rahmen der Studie wurden die Schädelkalotten von 17 Patienten analysiert. Dabei fand eine Aufteilung in zwei Gruppen statt: Die Schädel der Gruppe A (n=8) wurden bei -23°C konserviert, während die Gruppe B (n=9) eine Lagerungstemperatur von -80°C gewählt wurde. Eine weitere Gruppe C umfasste zwei sterile CAD (davon eines Vancomycin-ge tränkt) und wurde als Kontrollgruppe für den mikrobiologischen Teil der Studie herangezogen. Darüber hinaus wurden als mögliche prognostische Faktoren die folgenden Variablen in die statistische Analyse integriert:

- demografische Daten der Patienten: Alter (in Jahren), Geschlecht (m/f) sowie
- krankheitsspezifische Parameter und Faktoren des chirurgischen Eingriffs: Genese der malignen Hirnschwellung (Schlaganfall vs. sSHT), Schädelbruch (ja/nein), Infektion während des stationären Aufenthalts (ja/nein), Dauer der DH (in Minuten), Dauer und Temperatur der Konservierung (-23°C vs. -80°C).

1.2.1 Ziele der klinischen Studie

Die durchgeführte Studie wurde in einen mikrobiologischen sowie einen pathologischen Teil unterteilt. Der mikrobiologische Teil wurde durchgeführt, um zwischen den Gruppen nicht nur Unterschiede bei tatsächlichen Infektionsraten, sondern auch hinsichtlich des Infektionspotenzials identifizieren zu können. Dazu sollte zunächst ein Vergleich des mikrobiologischen Status zwischen den explantierten Deckeln der Gruppe A vs. der Gruppe B mittels einer bakteriellen Kultur hergestellt werden. Darüber hinaus sollte das Infektionspotenzial nach Kontamination der explantierten Deckel und der CAD-Implantate mit

spezifischen Keimstämmen hinsichtlich des Wachstums der Erreger bei den Gruppen A, B und C verglichen werden.

In der pathologischen Analyse hingegen wurden spezifische Parameter des Knochenmetabolismus wie der Parathyroid Hormone Type 1 Receptor (PTH1R) und Osteoprotegerin (OPG) sowie mikroskopische Zeichen einer Osteonekrose untersucht. Der PTH1R weist eine hohe Expression sowohl im Knochen- als auch im Nierengewebe auf. Im spezifischen Kontext des Knochens ist dieser Rezeptor auf der Oberfläche von Osteoblasten zu finden. Sobald der Rezeptor durch die Bindung von PTH aktiviert wird, führt dies zur Expression von RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand) durch die Osteoblasten und somit zur Erhöhung der Resorptionsrate vom Knochen (Fan et al., 2017; Martin, 2022). Die OPG spielt hingegen durch seine Funktion als Decoy-Rezeptor im Rahmen des RANK/RANKL/OPG-Systems eine bedeutende Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels, indem sie die Osteoklastogenese und die Resorption von Knochengewebe hemmt (Infante et al., 2019; Marcadet et al., 2022).

Das Ziel der pathologischen Analyse lag dabei in der Identifikation von potenziellen Quellen einer sekundären Osteonekrose nach Kranioplastik. Von besonderem Interesse war der zeitliche Aspekt, d. h. die Fragestellung, ob der Prozess der Osteonekrose bereits nach der DH beginnt und während der Kryokonservierung fortschreitet. Neben einer Expressionsanalyse im explantierten Schädelknochen (Kortikalis und Spongiosa) von Biomarkern des Knochenmetabolismus (PTH1R und OPG) mittels Immunohistochemie in den Gruppen A und B wurde mittels H&E-Färbung der Grad der Knochenavitalität als Vorstufe der Osteonekrose ausgewertet. Diese Auswertungen wurden im Dezember 2020 durchgeführt und nach sechs Monaten im Juni 2021 wiederholt.

1.2.2 Materialsammlung und Lagerung

Die explantierten Schädeldeckel wurden während der Hemokraniektomie steril in Plastikbeuteln verpackt und in einem medizinischen Gefrierschrank bei Temperaturen von -23°C bei DH zwischen Juni und November 2019 bzw. bei -80°C bei DH zwischen Dezember 2019 und Oktober 2020 aufbewahrt. Das Auftauen der Schädelkalotte erfolgte unter streng aseptischen Bedingungen bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von zwei Stunden. Die Knochen wurden mit Hammer und Knochenstanze zerkleinert. Die daraus

gewonnenen zentral gelegenen Knochenfragmente (Kortex und Spongiosa) wurden zur weiteren mikrobiologischen (ca. 0,8 x 2 cm) und pathologischen (ca. 0,5 x 0,5cm) Untersuchung gesammelt.

1.2.3 Mikrobiologische Analyse

Die mikrobiologische Analyse berücksichtigte sowohl aerobe als auch anaerobe Bedingungen. Für die aerobe mikrobiologische Analyse wurden zwei exemplarische Knochenfragmente auf Schokoladen- (Chocolate PolyViteX Agar, bioMérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich) sowie auf Blutagar (Columbia-Agar mit 5 % Schafblut, BD, Heidelberg) aufgebracht. Daraufhin wurde flüssige Gehirn-Hirn-Infusion (BB™ Brain Heart Infusion, BD, Heidelberg) zur Anreicherung hinzugefügt.

Die anaerobe Kultur wurde mithilfe einer anaeroben (Schaedler-Agar mit 5 % Schafblut, BD, Heidelberg) Blutagarplatte sowie mittels flüssigem Thioglycolat-Medium (BBL™ Enriched Thioglycollate Medium with Vitamin K1 & Hemin, BD, Heidelberg) zur Anreicherung angelegt.

Die inokulierten Medien wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen bei einer Umgebungstemperatur von 35°C bei einem CO₂-Partialdruck von 5 % inkubiert. Nach 48 Stunden, sieben und 14 Tagen wurde das mikrobielle Wachstum beurteilt und halbquantitativ (leicht, mäßig, stark) bei den positiven Bakterienkulturen kategorisiert.

Sofern nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen keine Hinweise auf bakterielles Wachstum vorlagen, wurden Subkulturen angelegt, die von den genannten flüssigen Anreicherungsmedien auf Blutagar bzw. anaeroben Blutagar übertragen wurden. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei gleichen Bedingungen (35°C, 5 % CO₂) wurden die Bakterien mithilfe der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation-Tme off light mass spectrometry-Methode (MALDI-TOF MS) identifiziert.

In einem nächsten Arbeitsschritt wurden mit den übrigen drei Fragmenten der Schädelkalotten (Gruppe A und B) sowie den drei Fragmenten jedes CAD-Schädels (Gruppe C) Kontaminationsexperimente durchgeführt. Jedes Knochen- bzw. CAD-Fragment wurde in eine Suspension der Referenzstämme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 und *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 überführt. Die

Stämme enthielten eine Konzentration von 10^3 koloniebildenden Einheiten (CFU)/ml in PBS-Puffer. Die mit den Bakterienstämmen kontaminierten Schädelfragmente wurden über Nacht bei 5°C im Kühlschrank gelagert. In Abb 1 ist beispielhaft ein extrahierter Schädellappen dargestellt, der für die Bakterienkulturen verwendet wurde.

Am darauffolgenden Morgen wurden die kontaminierten Fragmente abgetrocknet und auf Schokoladen-Blutagarplatten aufgebracht (*S. aureus*- und *S. epidermidis*-kontaminierte Fragmente) bzw. auf anaeroben Blutagarplatten ausgerollt (*C. acnes*-kontaminierte Fragmente). Die Fragmente wurden daraufhin jeweils in ein Thioglykolat-Medium gegeben und unter den beschriebenen Bedingungen aufbewahrt.



Abb 1: Schädellappen explantiert nach DH, für Bakterienkulturen verwendet (Adaptiert nach Agrawal et al., 2022)

1.2.4 Pathologische Analyse

Von den Schädelkalotten wurden jeweils mindestens fünf 0,5 x 0,5 cm große Fragmente aus den zentralen Regionen extrahiert und in sterilen Röhrchen (gefüllt mit Formaldehyd-lösung) gesammelt. Die Fragmente, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet waren, wurden anschließend entkalkt und in Mikrometer-dünne Proben geschnitten. Es folgte eine H&E-Färbung sowie eine Immunfärbung zur Detektion von PTH1R und OPG mit einem vollautomatischen Leica Biosystem (Bond maX/Bond III-Vollautomatiksystem).

Die polyklonalen Antikörper zu PTH1R sowie zu OPG wurden gemäß den Protokollen des Herstellers verwendet (PTH1R: Katalog PA1-20597, Invitrogen, Verdünnung 1:200; OPG: bs-0431R, BIOSS). Anschließend wurde die Immunreaktivität in der Zellmembran für PTH1R sowie im Zellplasma für OPG quantifiziert und die Anzahl der positiven Zellen (Osteoblasten) im Verhältnis zu allen identifizierten Zellen dokumentiert.

Die Expression von PTH1R sowie von OPG wurde mithilfe eines Zeiss-Lichtmikroskops (Zeiss Axio Imager.D2) sowie der H&E-Färbung bewertet. Das Lichtmikroskop wurde zudem dazu verwendet, die H&E-Schnitte zu scannen (Zeiss Imager.D2, Kamera Zeiss Axiocam 506 Farbe, Fotografie Zen2pro mit 10-50-facher Vergrößerung). Das Ausmaß der leblosen Zellen (Avitalität), die als Abwesenheit von Osteozyten in leeren osteozytischen Lacunen definiert wurde, wurde in den eingescannten H&E-Färbungen mithilfe der Image J-Software berechnet.

Die Knochenlappen der Gruppe A (-23°C Lagerungstemperatur) sowie der Gruppe B (-80°C Lagerungstemperatur) wurden mithilfe von Wilcoxon-Tests verglichen. Log-lineare gemischte Regressionsmodelle mit zufälligem Intercept wurden verwendet, um wiederholte Messungen, d.h. die Expression von avitalem Gewebe derselben Knochenlappen zu berücksichtigen und potenzielle Prognosefaktoren der Knochenavitalität zu identifizieren. Hierbei wurden die Lagerungstemperatur und der Zeitpunkt der Bewertung der avitalen Bereiche als Kovariate berücksichtigt. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Demografische Daten der Studienpopulation

Die demografischen Daten der Studiengruppe sind in Tab. 1 dargestellt. Es wurden insgesamt 17 kryokonservierte Schädelkalotten (Gruppe A, Lagerungstemperatur -23°C, n=8; Gruppe B, Lagerungstemperatur -80°C, n=9) sowie 2 CAD (davon 1 mit Vancomycin getränkt) untersucht. Die Schädelkalotten wurden nach den folgenden Krankheitsereignissen gewonnen:

- Zustand nach Infarkt oder Spontanblutung (n=11)
- schweres SHT (n=6).

Drei der 17 untersuchten Schädelkalotten waren gebrochen. Das durchschnittliche Patientenalter lag bei 70 Jahren und 53 % der Patienten wären männlich.

Die mittlere operative Dauer der DH lag bei 125 Minuten, wobei keine prä- oder intraoperativen Infektionszeichen identifiziert werden konnten. Postoperative Infektionen traten bei 8 von 17 Patienten auf. Die Kryokonservierung wurde für durchschnittlich 10,5 Monate durchgeführt (Minimum: 2 Monate; Maximum: 17 Monate).

Hinsichtlich der demografischen Daten der Studienpopulation wurden keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede (Gruppe A vs. Gruppe B) festgestellt. Allerdings lag die durchschnittliche Lagerungsdauer in Gruppe A mit 13,5 Monaten deutlich über der Lagerungsdauer der Gruppe B mit 7 Monaten ($p=0,003$).

Tab. 1: Demografische Daten der Studiengruppe (Adaptiert nach Agrawal et al., 2022)

Variable	-23°C (Gruppe A)	-80°C (Gruppe B)	p-Wert
N	8	9	
Alter (Median, Q1; Q3)	67,5 (58; 77.5)	71 (53; 76)	n.s
Männliche Patienten	4 (50%)	5 (55,5%)	n.s
Schweres SHT	2 (25%)	4 (44,5%)	n. s
Schädelbruch	1 (12,5%)	2 (22,2%)	n. s
Präoperative Infektionen vor DH	0 (0,0%)	0 (0,0%)	n. s
Dauer des chirurgischen Eingriffs (Median, Q1, Q3)	129,5 (122; 210)	125 (120; 160)	n.s
Postoperative Infektionen nach DH	4 (50%)	4 (44,5%)	n.s

1.3.2 Mikrobiologische Ergebnisse

Bei den inokulierten Medien, die über einen Zeitraum von zwei Wochen unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen kultiviert wurden, konnten keine Mikroorganismen nachgewiesen werden. In den Subgruppen, bei welchen eine Kontamination mit *S. aureus*, *S.*

epidermidis bzw. *C. acnes* stattfand, zeigten jedoch alle Proben eine ähnliche bakterielle Wachstumskurve (siehe Abb).

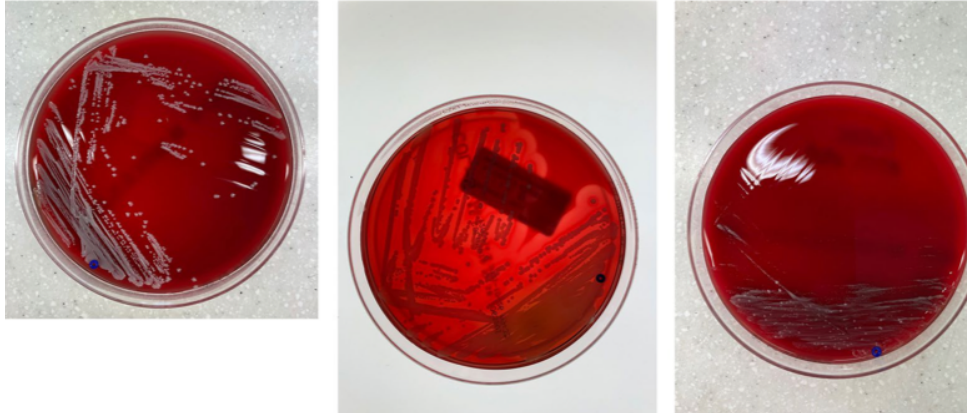


Abb. 2: Typisches Bakterienwachstum nach Kontamination mit *S. aureus* (links), *S. epidermidis* (Mitte) und *C. acnes* (rechts) (Adaptiert nach Agrawal et al., 2022)

1.3.3 Pathologische Ergebnisse

Die kryokonservierten Proben der Schädelkalotten wurden mikroskopisch untersucht, um das Ausmaß von Ischämie und Osteonekrose zu bewerten. Definitorisch für die Charakterisierung der Avitalität wurden insbesondere leere osteozytische Lacunen herangezogen, die sich histologisch zeigten und entsprechend quantifiziert werden konnten (siehe Abb. 2).

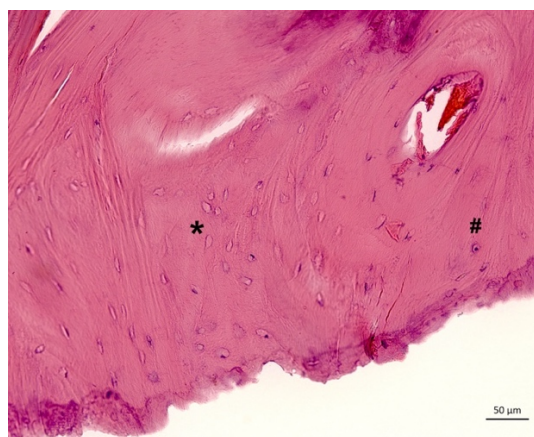


Abb. 2: H&E-Färbung, Normale Osteozyten (#), histologisches Zeichen einer Osteonekrose (leeren Osteozyten mit * markiert) (Adaptiert nach Gousias et al., 2023)

Darüber hinaus existieren weitere Hinweise für Ischämie (z. B. Ghosting im fett- und hämopoetischen Knochenmark oder die Proliferation von Mikrogefäßen), die jedoch nur punktuell identifiziert und nicht systematisch dokumentiert wurden.

In der immunhistochemischen Färbung der Proben konnte in der Zellmembran die Expression von PTH1R sowie im Zellplasma von OPG nachgewiesen werden. In Abb. 3 ist die immunhistochemische Färbung von PTH1R in der Zellmembran dargestellt.

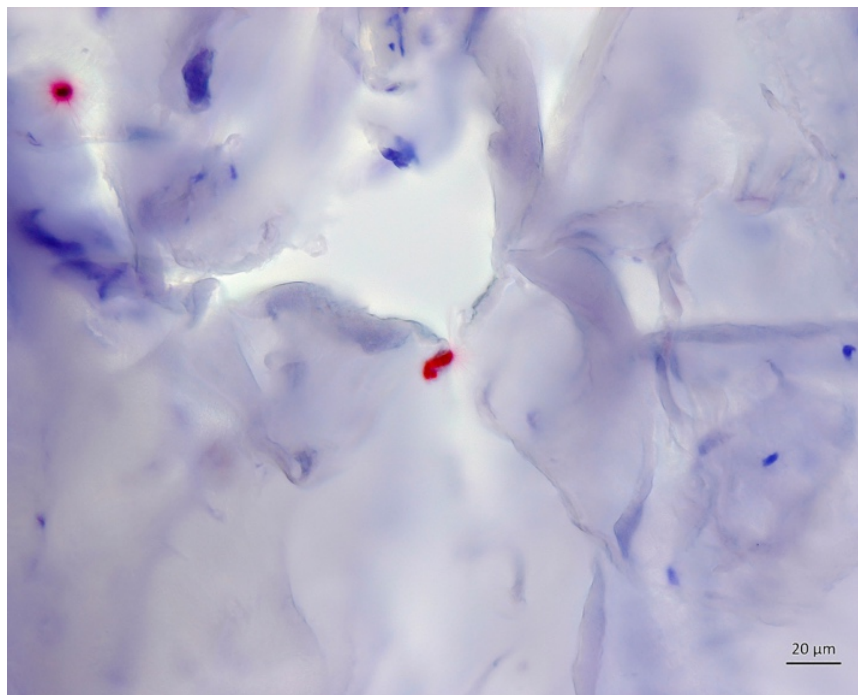


Abb. 3: Immunohistochemische Färbung der Zellmembran für PTH1R (rot) (Adaptiert nach Gousias et al., 2023)

Die univariate Analyse zeigte, dass der Anteil der PTH1R-positiven Zellen je High Power Field (HPF) bei Gruppe A und B vergleichbar war. Die Expression von OPG war in den Schädelkalotten der Gruppe A, die bei -23°C gelagert wurden, jedoch höher ausgeprägt (PTH1R-relativer Anteil/HPF bei -23°C vs. bei -80°C, Median: 1,61 % vs. 2,34 %, $p=0,923$; OPG-relativer Anteil/HPF bei -23°C vs. bei -80°C, Median: 6,91 % vs. 1,32 %, $p=0,039$). Zum Ausschluss einer Verzerrung durch Variablen wie Alter und Geschlecht der Patienten wurde ein Poisson-Modell erstellt, nach dessen Anwendung die Signifikanz der höheren OPG-Expression in Gruppe A jedoch erhalten blieb.

Im Dezember 2020 sowie im Juni 2021 wurde der Anteil von avitalem Gewebe zum Gesamt-Gewebe in den Gruppen A und B bewertet. In allen untersuchten Schädelkalotten zeigte sich ein relevantes Ausmaß von Avitalität, bereits nach einer Lagerungszeit von mehreren Wochen. Die Subgruppenanalyse zeigte in der initialen Untersuchung, dass die Schädelkalotten der Gruppe A (Lagerungstemperatur -23°C) einen höheren relativen Anteil von avitalem Gewebe aufwies als die Kalotten der Gruppe B (Lagerungstemperatur -80°C). Diese Beobachtung konnte in der wiederholten Untersuchung nach sechs Monaten jedoch nicht bestätigt werden (initiale Untersuchung avitales Gewebe/totaler Gewebeschicht bei -23°C vs. bei -80°C, Median: 2,51 % vs. 0,03 %, $p=0,008$; wiederholte Untersuchung avitales Gewebe/totaler Gewebeschicht bei -23°C vs. bei -80°C, Median: 13,16 % vs. 8,34%, $p=0,470$, siehe Tab. 2). Auffällig war jedoch, dass insgesamt in beiden Gruppen bei der Wiederholungsmessung hochsignifikant höhere Anteile von avitalem Gewebe festgestellt werden konnten ($p<0,001$).

Tab. 2a: Expressionsprofil von PTH1R und OPG sowie Knochenavitalität (Adaptiert nach Gousias et al., 2023)

Variable	-23°C	-80°C	p-Wert
	Median, Quartile (25th-75th Perzentie)	Median, Quartile (25th-75th Perzentile)	
PTH1R	1,61 % (0,91-4.46)	2,34 % (0,99-4.76)	P=0.923
OPG	6,91 % (3.88-12.53)	1.32 % (0,99-2.44)	P=0.039
Avital Bereiche	2,51 % (1,19-4,36)	0.03 % (0,00-0,09)	P=0.008
Avital Bereiche (wiederholte nach 6 Monaten)	13,16 % (6,86-16.68)	8,34 % (5.22-15.36)	P=0.470

Die univariaten Analysen haben längere Lagerungsdauern als signifikanten Prädiktor für höhere Anteile von avitalem Gewebe in den konservierten Schädelkalotten identifiziert ($p<0,001$). Darüber hinaus konnte jedoch kein Einfluss weiterer Variablen wie dem Alter

und Geschlecht der Patienten oder klinischen Faktoren (z. B. Ursache der Hirnschwellung, Infektionen) auf das Ausmaß von avitalem Gewebe festgestellt werden. Das lineare gemischte Regressionsmodell hat die Lagerung bei -23°C ($p=0,006$) sowie eine längere Lagerungszeit ($p<0,001$) als unabhängige prognostische Faktoren für ein höheres Ausmaß an Avitalität bei explantierten Schädelkalotten identifiziert (siehe Tabelle 2b).

Tab. 2b: Ergebnisse (Fixeffekte) des log-linearen gemischten Modells mit zufälligem Versatz (Adaptiert nach Gousias et al., 2023)

Variable	Regression coefficients β (95% Vertrauensintervall)	$\exp(\beta)$ (95% Vertrauensintervall)	p-Wert
Gruppe (-23°C vs. -80°C)	2.77 (0.93; 4.60)	15.96 (2.53; 99.48)	0.006
Zeit (Anfangszeitpunkt vs. 6 Monate später)	-4.26 (-6.09; -2.43)	0.01 (0.00; 0.09)	< 0.001

1.4 Diskussion

Die DH wird als verhältnismäßig einfaches chirurgisches Verfahren beschrieben. Dennoch wird eine hohe Rate von Früh- und Spätkomplikationen beobachtet, zu welchen insbesondere sekundäre Knocheninfektionen und aseptische Knochennekrosen gehören (Brommeland et al., 2015; Gerstl et al., 2022; Malcolm et al., 2018; Mee et al., 2022; Melin et al., 2022; Schuss et al., 2013; Shepetovsky et al., 2021).

In vorangegangenen Untersuchungen wurden bereits Faktoren identifiziert, die mit einem höheren Risiko für die genannten unerwünschten Ereignisse assoziiert sind. Zu diesen gehören ein jüngeres Alter von Patienten, die Reimplantation von mehrfach fragmentierten Schädelfragmenten, ein ventrikuloperitonealer Shunt, ein obligatorischer Hydrozephalus oder mehrere Schädeloperationen (Brommeland et al., 2015; Cheah et al., 2017; Hng et al., 2015; Korhonen et al., 2018; Mee et al., 2022; Schwarz et al., 2016; Shepetovsky

et al., 2021; Signorelli et al., 2022). Als ursächlich für die höheren Raten von postoperativen Infektionen oder Knochenosteolysen wird zusätzlich eine suboptimale Kryokonservierung des Knochendeckels diskutiert (Agrawal et al., 2022; Bhaskar et al., 2011; Mirabet et al., 2021). In diesem Rahmen haben wir unsere klinische Studie DRKS00023283 durchgeführt. Sie hatte zum Ziel, spezifische Lagerungsparameter von explantierten Deckeln als mögliche Ursachen auf die genannten sekundären Komplikationen zu analysieren.

Im Rahmen der Studie wurde eine mikrobiologische Analyse durchgeführt. In vorangegangenen Studien wurde auch nach zusätzlichen prophylaktischen Maßnahmen (z. B. Autoklavieren und Eintränken in Lösungen mit Antibiose) ein hohes Ausmaß von postoperativen Knocheninfektionen festgestellt (z. B. Autoklavieren und Eintränken in Lösungen mit Antibiose) (Fan et al., 2017; Wui et al., 2016). Daher sollte mit unserer Studie untersucht werden, ob die Infektion mit Mikroorganismen bereits während der Konservierung stattfindet.

In einer Untersuchung von Fan et al. (2017) wurden 989 Schädelkalotten in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert. Trotz der niedrigen Temperaturen und der Verwendung von Dimethylsulfoxid als Kryoschutzmittel wurde nach der Kranioplastik eine Infektionsrate von 4,06 % festgestellt. In einer weiteren Studie von Wui et al. (2016) wurden Schädeldeckel, die zuvor bei -70°C kryokonserviert wurden, vor der Reimplantation zusätzlich durch Autoklavieren sterilisiert. Trotz dieses Vorgehens wurden Infektionsraten von 38,5 % dokumentiert (Wui et al., 2016). Tahir et al. (2013) verwendeten einen anderen Ansatz und legten die Schädelkalotten, die bei -26°C kryokonserviert wurden, vor der Reimplantation in eine Lösung aus Kochsalzlösung, Wasserstoffperoxid, Povidon-Jod-Lösung und Antibiotika ein und wiesen dennoch postoperative Infektionsraten von 3,4 % aus (Tahir et al., 2013).

Unsere Analyse schloss eine aktive Knocheninfektion aus, als die bakterielle Kultur kein Wachstum in beiden Gruppen A und B zeigte. Cho et al. (2017) legten eine ähnliche bakterielle Kultur bei 47 explantierten Schädelkalotten an, welche bei -70°C für 9 bis 161 Monaten kryokonserviert wurden. Die Autoren stellten ebenfalls kein bakterielles Wachstum fest (Cho et al., 2017). In der Studie von Cho et al. (2017) wurde jedoch kein Vergleich von unterschiedlichen Lagerungstemperaturen durchgeführt.

In unserer Studie fand neben den normalen Bakterienkulturen eine Kontamination mit spezifischen Pathogenen statt, um ein unterschiedliches Infektionspotenzial in Abhängigkeit von den Konservierungsbedingungen der Gruppe A und B sowie zwischen explantierten Schädeldeckeln und CAD zu untersuchen. Es zeigte sich jedoch bei den drei verwendeten Pathogenen eine ähnliche bakterielle Wachstumskurve, sodass im mikrobiologischen Teil der Studie kein Unterschied hinsichtlich der Lagerungstemperatur (-23°C vs. -80°C) auf das Infektionspotenzial festgestellt werden konnte.

In der pathologischen Analyse im Rahmen der Studie konnten jedoch neue Erkenntnisse zum Knochenmetabolismus und zur Vitalität der Knochenzellen während der Konservierung der Schädelkalotten hervorgebracht werden. Es wurde ein ungewöhnlich hoher Anteil von avitalem Gewebe in den explantierten Schädeldeckeln im Vergleich zu den Referenz-Knochenwerten in der Initialuntersuchung festgestellt. Darüber hinaus zeigten Schädellappen mit längeren Lagerungszeiten sowie diejenigen mit einer Lagerungstemperatur von -23°C eine signifikant höhere Avitalität im Knochengewebe. Eine wiederholte Analyse nach sechs Monate zeigte noch höhere Werte der Knochenavitalität,

Es wurde bereits ein möglicher Zusammenhang zwischen der Langzeitlagerung von biologischem Material und einer verminderten Lebensfähigkeit diskutiert (Sugimoto et al., 2021). Allerdings wird allgemein davon ausgegangen, dass die Kryokonservierung bei -80°C die Lebensfähigkeit und Funktion lebender Zellen und Gewebe verlängert, wenn die Zellen in die stationäre Phase eintreten und der Stoffwechsel vermindert wird (Hernandez-Tapia et al., 2020; Pegg, 2015). Ebenso gibt es Forschungsgruppen, die eine verminderte Lebensfähigkeit biologischer Materialien nach Langzeitlagerung berichtet haben (Sugimoto et al., 2021).

Vorhandene Knochenstudien zeigten, dass explantierte Schädelkalotten, die länger als sechs Monate bei -30°C kryokonserviert werden, nur noch wenige lebende Zellen enthalten, sodass eine Osteonekrose bedingt wird (Bhaskar et al., 2011). Chan et al. (2017) führten Osteoblastenkulturen bei 18 Schädellappen durch, die 4 bis 55 Monate bei -80°C gelagert wurden und fanden nach der Lagerung keine lebensfähigen Osteoblastzellen vor

(Chan et al., 2017). In einer ähnlichen Studie führten Cho et al. (2017) eine Osteoblastenkultur bei 47 Knochendeckeln durch, ohne eine lebensfähige Osteoblastenproliferation nach einer Lagerung von 9 bis 161 Monaten bei -70°C festzustellen (Cho et al., 2017).

Obwohl eine längere Kryokonservierungszeit zu einer verminderten Knochenavitalität führen könnte, wurde bisher kein Zusammenhang zwischen der Lagerungstemperatur und der Knochenlebensfähigkeit gemeldet. Unsere Studie gibt Hinweise darauf, dass die Lagerung bei -80°C vorteilhaft gegenüber der Lagerung bei -23°C sein könnte, da der Übergang der Zellen in die stationäre Phase als protektive Maßnahme gegenüber der Entwicklung von avitalem Gewebe wirkt. Dabei weist unsere Studie den Vorteil auf, dass die Lagerung bei -23°C und -80°C in derselben klinischen Einrichtung mit gleichbleibenden Managementprotokollen und Untersucher durchgeführt wird. Damit wird eine Verzerrung durch unterschiedliche Institute, Standorte oder untersuchende Personen vermieden.

Derzeit existieren keine etablierten Protokolle für die optimale Lagerung von explantierten Schädelkalotten nach DH (Melin et al., 2022; Mirabet et al., 2021). Das Ergebnis der durchgeführten Studie zeigt jedoch einen klaren Vorteil der Kryokonservierung bei -80°C , der in Zukunft bei der Lagerung von explantierten Schädelkalotten berücksichtigt werden sollte.

Unsere Studie untersuchte zudem mit PTH1R und OPG zwei wichtige Faktoren, die als Schlüsselfaktoren im Knochenstoffwechsel gelten. Eine erhöhte Expression von PTH1R stimuliert den Knochenresorptionsprozess durch die Aktivierung von Osteoklasten, während OPG den Knochenabbau schützt sowie die Osteoklastenbildung durch die Bindung an RANKL und TRAIL (tumour necrosis factor–related apoptosis inducing ligand) hemmt (Gunsser et al., 2019). Die nachgewiesenen niedrigen PTH1R- und OPG-Werte in unserer Studie beweisen eine signifikante Verringerung des Knochenumsatzes, woraus eine verminderte Stoffwechselaktivität bei -80°C geschlussfolgert werden kann.

Derzeit werden bei Kranioplastik-Operationen entweder ABF (Autologous Bone Flap) oder SF (Synthetic Flap) je nach Richtlinien der jeweiligen Einrichtung verwendet. In jüngerer Vergangenheit wurde SF zunehmend insbesondere bei jüngeren Patienten benutzt. Aufgrund der geringeren Kosten der ABF wird diese jedoch weiterhin bei Hirntraumata mit mehreren Knochenfragmenten eingesetzt (Do et al., 2022; Gerstl. et al., 2022).

Die Lebensfähigkeit reimplantierter ABFs kann bisher nicht definitiv bestimmt werden. In den Studien von Chan et al. (2017) sowie von Cho et al. (2017) wurden keine Osteoblasten von den Knochen, die langfristig kryokonserviert wurden, extrahiert (Chan et al., 2017; Cho et al., 2017). Ebenso liegen für ABFs, die nur wenige Monate eingefroren wurden, keine Daten vor. Darüber hinaus können ABFs, die zunächst nicht lebensfähig erscheinen, nach der Reimplantation dennoch einem Knochenumbau unterzogen werden und ihre Lebensfähigkeit wiederlangen.

In unserer Studie untersuchten wir die mikroskopische Architektur der ABFs, die über Wochen bis Monate eingefroren wurden. Dieses Vorgehen entspricht ähnlichen Studien an Fibula- und Kaninchenmodellen (Andrade et al., 2008; Shaw et al., 2012). Unsere Ergebnisse stützen die Schlussfolgerung von Goettsche et al. (2021), die elf Knochendeckel, die bei -80°C kryokonserviert und aufgrund einer aseptischen Knochennekrose nach Reimplantation erneut explantiert wurden, untersuchten. In der mikroskopischen Analyse wurden durch Goettsche et al. (2021) erhebliche strukturelle Veränderungen wie ein Verlust der Differenzierung in den Kortikalis- und Kancellknochen sowie eine Knochenverformung in bestimmten Bereichen festgestellt. Allerdings wurden, analog zu unserer Studie, avitale Osteozyten im aseptischen nekrotisierten Knochen festgestellt. Avitale Osteozyten binden an lokale BRF (Bone regenerating factor), welche Osteoklasten rekrutieren, um die avitale Osteozyten zu absorbieren und die Knochenautolyse einzuleiten (Aguirre et al., 2006; Davis et al., 2019; Plotkin, 2014; Verborgt et al., 2000).

Basierend auf unseren Erkenntnissen kann vermutet werden, dass das reimplantierte ABF zunächst als biokompatibles Grundgerüst fungiert, welches anschließend durch das benachbarte gesunde Knochengewebe zur Regeneration stimuliert wird. Das Vorhandensein von avitalen Osteozyten kann jedoch zu einer unerwünschten Knochennekrose beitragen.

Unsere Studie weist verschiedene Limitationen auf. Zu diesen gehört das retrospektive Studiendesign sowie das kleine Patientenkollektiv, welches für die Materialgewinnung herangezogen wurde. Die statistische Analyse wurde durch die geringe Patientenanzahl erschwert. Dennoch handelt es sich bei unserer Studie um die erste Untersuchung mit

einem Vergleich von verschiedenen Lagerungstemperaturen bei kryokonservierten Schädelkalotten unter Einbezug von mikrobiologischen Faktoren und Parametern des Knochenstoffwechsels und der Knochenarchitektur.

1.5 Zusammenfassung

In der durchgeführten Studie wurde der Einfluss der Lagerungstemperatur (-23°C vs. -80°C) bei der Kryokonservierung von explantierten Schädelkalotten untersucht. Dazu wurden sowohl mikrobiologische als auch pathologische Analysen durchgeführt.

In der mikrobiologischen Analyse zeigte sich über einen Zeitraum von zwei Wochen kein Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Lagerungstemperaturen konservierten Schädeldeckeln. Bei der Kultivierung unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen konnte keine Mikroorganismen nachgewiesen werden und nach Kontamination mit drei spezifischen Bakterienstämmen zeigten alle entnommenen Proben unabhängig von ihrer Lagerungstemperatur eine ähnliche bakterielle Wachstumskurve.

Die pathologische Analyse hingegen zeigte zwischen den Gruppen A und B statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes von avitalem Gewebe, welches anhand von leeren osteozytischen Lacunen quantifiziert wurde. Zudem wurde festgestellt, dass eine längere Lagerungsdauer einen wesentlichen Prädiktor für höhere Anteile von avitalem Gewebe darstellt.

Angesichts der neuen Erkenntnisse, die im Rahmen der durchgeführten Studie gewonnen wurden, sollte die Verwendung bzw. Reimplantation von ABFs, insbesondere bei einem erhöhten Anteil von avitalem Gewebe, kritisch betrachtet werden. Unsere Studie zeigte, dass ABFs bei einer Konservierung über drei Monate bei -23°C eine ungewöhnlich hohe Avitalität aufwiesen. Daher empfehlen wir eine sorgfältige Abwägung, ob die potenziellen Vorteile einer ABF-Reimplantation die erheblichen Risiken einer aseptischen Osteonekrose und die verbundenen, möglichen Folgen rechtfertigen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Agrawal R, Rompf C, Pranada AB, Vollmar P, De Lorenzo A, Hoyer A, Gousias K. Microbiological profile and infection potential of different cryopreserved skull flaps after decompressive hemicraniectomy. Is cryopreservation at - 80 °C better? BMC Res Notes. 2022 ;15(1):167

Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. J Bone Miner Res. 2006;21(4):605-615

Alkhaibary A, Alharbi A, Alnefaie N, Oqalaa Almubarak A, Aloraidi A, Khairy S. Cranioplasty: A Comprehensive Review of the History, Materials, Surgical Aspects, and Complications. World Neurosurg 2020; 139:445-452

Andrade MG, Sa CN, Marchionni AM, dos Santos Calmon de Bittencourt TC, Sadigursky M. Effects of freezing on bone histological morphology. Cell Tissue Bank. 2008;9(4):279-287

Bhaskar IP, Inglis TJ, Bowman J, Lee GY. Microbial contamination assessment of cryostored autogenous cranial bone flaps: should bone biopsies or swabs be performed? Acta Neurochir (Wien), 2013;155(2):367-371

Brommeland T, Rydning PN, Pripp AH, Helseth E. Cranioplasty complications and risk factors associated with bone flap resorption. Scand J Trauma Resusc Emerg Med 2015;23:75

Chan DYC, Mok YT, Lam PK, Tong CSW, Ng SCP, Sun TFD, Poon WS. Cryostored autologous skull bone for cranioplasty? A study on cranial bone flaps' viability and microbial contamination after deep-frozen storage at 80 C. Journal of clinical Neuroscience 2017; 42:81-83

Chea PP, Rosman AK, Cheang CK, Idris B. Autologous Cranioplasty Post-Operative Surgical Site Infection: Does It Matter if the Bone Flaps were Stored and Handled Differently? Malays J Med Sci 2017;24(6):68-74

Cho TG, Kang SH, Cho YJ, Choi HJ, Jeon JP, Yang JS. Osteoblast and Bacterial Culture from Cryopreserved Skull Flap after Craniectomy: Laboratory Study. *J Korean Neurosurg Soc* 2017;60(4):397-403

Davis HM, Valdez S, Gomez L, Malicky P, White FA, Subler MA, Windle JJ, Bidwell JP, Bruzzaniti A, Plotkin LI. High mobility group box 1 protein regulates osteoclastogenesis through direct actions on osteocytes and osteoclasts in vitro. *J Cell Biochem*. 2019;120(10):16741-16749

Do TH, Lu J, Palzer EF, Cramer SW, Huling JD, Johnson RA, Zhu P, Jean JN, Howard MA, Sabal LT, Hanson JT, Jonason AB, Sun KW, McGovern RA, Chen CC. Rates of operative intervention for infection after synthetic or autologous cranioplasty: a National Readmissions Database analysis. *J Neurosurg* 2022;138(2):514-521

Fan Y, Hanai JI, Le PT, Bi R, Maridas D, DeMambro V, Figueroa CA, Kir S, Zhou X, Mannstadt M, Baron R, Bronson RT, Horowitz MC, Wu JY, Bilezikian JP, Dempster DW, Rosen CJ, Lanske B. Parathyroid Hormone Directs Bone Marrow Mesenchymal Cell Fate. *Cell Metab*. 2017;25(3):661-672

Fölsch C, Mittelmeier W, von Garrel T, Bilderbeek U, Timmesfeld N, Pruss A, Matter HP. Influence of thermodisinfection and duration of cryopreservation at different temperatures on pull out strength of cancellous bone. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(1):73-81

Gerstl JVE, Rendon LF, Burke SM, Doucette J, Mekary RA, Smith TR. Complications and cosmetic outcomes of materials used in cranioplasty following decompressive craniectomy-a systematic review, pairwise meta-analysis, and network meta-analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 2022;164(12):3075-3090

Goettsche J, Mende KC, Schram A, Westphal M, Amling M, Regelsberger J, Sauvigny T, Hahn M. Cranial bone flap resorption-pathological features and their implications for clinical treatment. *Neurosurg Rev*. 2021;44(4):2253-2260

Gousias K, Stricker I, Hoyer A, Theocharous T, Rompf C, Pranada AB, Tannapfel A, Agrawal R, Tischoff I. Explanted Skull Flaps after Decompressive Hemicraniectomy

Demonstrate Relevant Bone Avitality-Is Their Reimplantation Worth the Risk? *Brain Sciences*. 2023;13(9):1277

Gunsser J, Hermann R, Roth A, Lupp A. Comprehensive assessment of tissue and serum parameters of bone metabolism in a series of orthopaedic patients. *PLoS One*. 2019;14(12):e0227133

Hernandez-Tapia LG, Fohlerova Z, Zidek J, Alvarez-Perez MA, Celko L, Kaiser J, Montufar EB. Effects of Cryopreservation on Cell Metabolic Activity and Function of Biofabricated Structures Laden with Osteoblasts. *Materials (Basel)*. 2020;13(8):1966

Hng D, Bhaskar I, Khan M, Budgeon C, Damodaran O, Knuckey N, Lee G. Delayed Cranioplasty: Outcomes Using Frozen Autologous Bone Flaps. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr* 2015; 8:190–197

Honeybul S, Ho KM. Cranioplasty: morbidity and failure. *Brit J Neurosurgery* 2016;30: 523-528

Infante M, Fabi A, Cognetti F, Gorini S, Caprio M, Fabbri A. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):12

Korhonen TK, Salokorpi N, Niinimäki J, Serlo W, Lehenkari P, Tetri S. Quantitative and qualitative analysis of bone flap resorption in patients undergoing cranioplasty after decompressive craniectomy. *J Neurosurg* 2018;130(1):312-321

Malcolm JG, Mahmooth Z, Rindler RS, Allen JW, Grossberg JA, Pradilla G, Ahmad FU. Autologous Cranioplasty is Associated with Increased Reoperation Rate: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg* 2018;116:60-68

Marcadet L, Bouredji Z, Argaw A, Frenette J. The Roles of RANK/RANKL/OPG in Cardiac, Skeletal, and Smooth Muscles in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:903657

Martin TJ. PTH1R Actions on Bone Using the cAMP/Protein Kinase A Pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 12:833221

Mee H, Anwar F, Timofeev I, Owens N, Grieve K, Whiting G, Alexander K, Kendrick K, Helmy A, Hutchinson P, Kolias A. Cranioplasty: A Multidisciplinary Approach. *Front Surg* 2022;9:864385

Melin S, Haase I, Nilsson M, Claesson C, Ostholm Balkhed A, Tobieson L. Cryopreservation of autologous bone flaps following decompressive craniectomy: A new method reduced positive cultures without increase in post-cranioplasty infection rate. *Brain Spine*. 2022; 2:100919

Mirabet V, Garcia D, Yague N, Larrea LR, Arbona C, Botella C. The storage of skull bone flaps for autologous cranioplasty: literature review. *Cell Tissue Bank*. 2021;22(3):355-367

Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2015; 1257:3-19

Plotkin LI. Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12(1):121-126

Ramalingam S, Samsuddin SM, Yusof NA, Mohd S, Hanafi NN, Min NW, Mansor A . Performance of cooling materials and their composites in maintaining freezing temperature during irradiation and transportation of bone allografts. *Journal of Orthopaedic Surgery*. 2018;26(2):230949901877090

Schuss P, Vatter H, Marquardt G, Imöhl L, Ulrich CT, Seifert V, Güresir E. Cranioplasty after decompressive craniectomy: the effect of timing on postoperative complications. *J Neurotrauma*. 2012;29(6):1090-1095

Schwarz F, Dünisch P, Walter J, Sakr Y, Kalff R, Ewald C. Cranioplasty after decompressive craniectomy: is there a rationale for an initial artificial bone-substitute implant? A single-center experience after 631 procedures. *J Neurosurg* 2016;124(3):710-715

Shaw JM, Hunter SA, Gayton JC, Boivin GP, Prayson MJ. Repeated freeze-thaw cycles do not alter the biomechanical properties of fibular allograft bone. *Clin Orthop Relat Res*. 2012;470(3):937-943

Shepetovsky D, Mezzini G, Magrassi L. Complications of cranioplasty in relationship to traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurg Rev* 2021;44(6):3125-3142

Signorelli F, Giordano M, Caccavella VM, Ioannoni E, Gelormini C, Caricato A, Olivi A, Montano N. A systematic review and meta-analysis of factors involved in bone flap re-sorption after decompressive craniectomy. *Neurosurg Rev* 2022;45(3):1915-1922

Sugimoto Y, Yamazaki Y, Moriyama K, Sugimoto T, Kumazawa K, Baba K, Sone Y, Takeda A. Differentiation and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation Comparison among cells stored for 1, 5, 10, 15, and 20 years. *Regen Ther.* 2021; 18:363-371

Tahir MZ, Shamim MS, Sobani ZA, Zafar SN, Qadeer M, Bari ME. Safety of untreated autologous cranioplasty after extracorporeal storage at – 26 degree Celsius. *Br J Neurosurg.* 2013;27(4):479-482

Tiefenboeck, T.M., Payr, S., Bajenov, O. Dengl T, Koch T, Komjati M, Sarahrudi K. Different storage times and their effect on the bending load to failure testing of murine bone tissue. *Sci Rep.* 10,2020;17412

Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res.* 2000;15(1):60-67

Wui, S.H, Kim KM, Ryu YJ, Kim I, Lee SJ, Kim J, Kim C, Park S. The Autoclaving of Autologous Bone is a Risk Factor for Surgical Site Infection After Cranioplasty. *World Neurosurg.* 2016;91:43-49

2 Veröffentlichungen

Agrawal et al. *BMC Research Notes* (2022) 15:167
<https://doi.org/10.1186/s13104-022-06042-y>

BMC Research Notes

RESEARCH NOTE

Open Access



Microbiological profile and infection potential of different cryopreserved skull flaps after decompressive hemicraniectomy. Is cryopreservation at -80°C better?

R. Agrawal^{1,2*} , C. Rompf³, A. B. Pranada³, P. Vollmar³, A. De Lorenzo⁴, A. Hoyer⁵ and K. Gousias^{1,6,7}

Abstract

Objective: Patterns of cryopreservation of explanted skull bone flaps have long been a matter of debate, in particular the appropriate temperature of storage. To the best of our knowledge no study to date has compared the microbiological profile and the infection potential of skull bone flaps cryostored at the same institution at disparate degrees for neurosurgical purposes. In the context of our clinical trial DRKS00023283, we performed a bacterial culture of explanted skull bone flaps, which were cryopreserved *lege artis* at a temperature of either -23°C or -80°C after a decompressive hemicraniectomy. In a further step, we contaminated the bone fragments in a suspension with specific pathogens (*S. aureus*, *S. epidermidis* and *C. acnes*, Colony forming unit CFU $10^3/\text{ml}$) over 24 h and conducted a second culture.

Results: A total of 17 cryopreserved skull flaps (8: -23°C ; 9: -80°C) explanted during decompressive hemicraniectomies performed between 2019 and 2020 as well as 2 computer-aided-designed skulls (1 vancomycin-soaked) were analyzed. Median duration of cryopreservation was 10.5 months (2–17 months). No microorganisms were detected at the normal bacterial culture. After active contamination of our skull flaps, all samples showed similar bacterial growth of above-mentioned pathogens; thus, our study did not reveal an influence of the storage temperature upon infectious dynamic of the skulls.

Keywords: Decompressive hemicraniectomy, Skull bone flaps, Cryostorage, Skull infection

Introduction

The decompressive hemicraniectomy (DC), i.e. the removal of part of the skullcap, is an established surgical method to manage life-threatening increased intracranial pressure as a consequence of a malignant brain swelling [1–3]. The latter may arise in the context of a severe traumatic brain injury (sTBI) or a major cerebral infarction. A

DC is then urgently indicated, since the contrary preservation of an intact rigid skull bony shell is highly associated with a critical entrapment of the brain stem into the tentorium slit. To this end, large prospective studies have confirmed a reduced mortality in patients, who underwent a DC after a malignant cerebral infarction compared to conservative managed patients [4–6].

The reconstruction of the DC-related cranial defects, called cranioplasty, is performed after the subsidence of the brain swelling and may be conducted either via reimplantation of their autologous explanted skull flap or implantation of a synthetic computer-aided-designed (CAD) bone flap. Currently, there is no

*Correspondence: agrawal.rachit@klinikum-luenen.de

¹ Department of Neurosurgery, St Marien Academic Hospital Lünen, University of Münster, K LW St. Paulus Corporation, Altstadtstrasse 23, 44532 Lünen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022, corrected publication 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

standard method of handling the explanted skull flaps. A traditional method is to preserve the skull flaps in a subcutaneous pocket in the abdominal wall [7, 8]. Alternatively, the bone flap may be stored in a medical freezer at -23°C to -80°C using aseptic technology [9, 10].

Although cranioplasty may be characterized as one of the simplest neurosurgical interventions, this procedure is related to a high risk of postoperative complications [11–13]. The complication rate of infections and autolysis of the reimplanted skull flaps is as high as 7–22% and 3–51%, respectively [3, 14, 15].

In order to analyze different patterns of cryostorage as a potential prognostic factor for later infections of skull flap implants, we conducted a retrospective study comparing the microbiological profile and the infection potential of explanted skull flaps stored at -23°C vs. -80°C .

Main text

Material and methods

Patients

The clinical trial DRKS00023283 (<http://apps.who.int/clinicalsearch/>) aimed to clarify whether different patterns of storage of explanted skull flaps after DC, in particular storage at different degrees of $^{\circ}\text{C}$, may prognosticate late complications after cranioplasty, among others infection of the skull flaps implants. To this end, we analyzed explanted skull flaps of only deceased adult patients, who underwent a DC in our Department between June 2019 and October 2020 for an acute malignant brain swelling. The trial has been approved by the local ethic committee of University of Muenster (ethic votum: 2020-340-f-S). Informed consent for inclusion in the research and publication was obtained by their legal representatives.

We included in our assays explanted skull flaps of 17 patients, 8 skulls were preserved at -23°C (group A), whereas 9 at -80°C . In addition, we assessed another group C, which comprised 2 sterile CAD (1 vancomycin-soaked). Specific parameters of demographics, surgical procedure and storage, i.e. age (years), sex (m/w), cause of malignant brain swelling (stroke vs. sTBI), additional skull fracture (yes/no), infection prior to DC (yes/no), duration of DC (minutes), duration (months) and temperature of cryostorage (23°C vs. -80°C) have been included as potential prognostic factors in our statistical analysis (Fig. 1). As endpoints of our study were defined (1) the identification of microorganisms in the bacterial cultures (yes/no) and (2) in case of growth, the patterns of the colonies (Fig. 2) of microorganisms, f.i. concentration of microorganism.

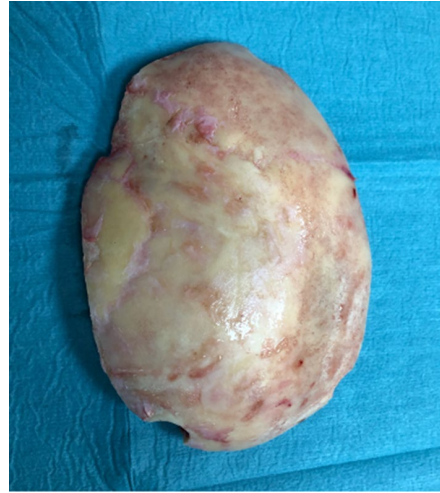


Fig. 1 Skull flaps explanted after DC used for bacterial culture

Material collection, storage and microbiological analysis

The bone flaps were collected during DC, sterile packed in triple plastic bags and stored in a medical freezer at a temperature of either -23°C (DCs between June and November 2019) or -80°C (DCs between December 2019 and October 2020). For the purposes of the microbiological assays, the skulls were thawed at room temperature for 2 h using strictly aseptic technology. The bone flaps were then crushed with a hammer and bone rongeur forceps; five of the resulting centrally located bone fragments (cortex and cancellous bone, sized approximately $0.8 \times 2\text{ cm}$) of each skull flap, have been processed for further microbiological investigations. Two of these fragments were used for aerobic and anaerobic cultures, respectively, according to quality standards of microbiological diagnostic [16].

For the purposes of the aerobic microbiological analysis each bone fragment was rolled out onto chocolate agar (Chocolate PolyViteX Agar, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and blood agar (Columbia agar with 5% sheep blood, BD, Heidelberg) and at least put in liquid brain heart infusion (BBL™ Brain Heart Infusion, BD, Heidelberg) for enrichment. By analogy, anaerobic culture was performed with an anaerobic blood agar plate (Schaefer agar with 5% sheep blood, BD, Heidelberg) and liquid thioglycolate medium (BBL™ Enriched Thioglycollate Medium with vitamin K1 & Hemin, BD, Heidelberg) for enrichment. The inoculated media were incubated for 14 days at 35°C ambient air plus 5% CO_2 . All media were assessed for growth at 48 h, 7 and 14 days. In case of positive cultures, extent of growth was quantified in a semiquantitative manner by categorizing as light, moderate or heavy growth. If

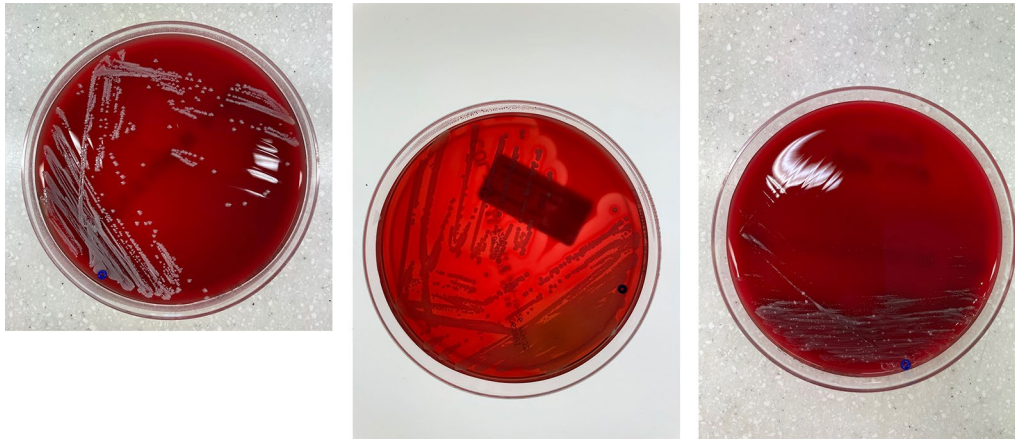


Fig. 2 Typical bacterial growth after contamination with *S. aureus*, *S. epidermidis* and *C. acnes*

solid media showed no growth after 14 days of incubation, subcultures from the liquid enrichment media were performed on blood agar or anaerobic blood agar, respectively, followed by an incubation period of three days under conditions described above. MALDI-TOF MS was employed for bacterial identification.

In a second step, contamination experiments were performed with the remaining three of the five fragments of each skull flap (group A and B) as well as the three fragments of each of the CAD skulls (group C). Each of the bone and CAD fragments were transferred to a suspension of the reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, and *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 at a concentration of 10^3 colony forming unit (CFU)/ml in PBS and then stored in a refrigerator overnight at 5 °C.

The following morning, the contaminated fragments were wiped dry on a sterile gauze pad. Subsequently, *S. aureus*- and *S. epidermidis*-contaminated fragments were rolled out onto chocolate blood agar plates, whereas *C. acnes*-contaminated fragment onto anaerobic blood agar plate. Each fragment was then placed in thioglycolate

medium. Culture conditions were chosen and procedures were conducted as described above.

Standard statistical methods were used for the comparisons between the subgroup. Additionally, we used a linear mixed model to account for repeated measurements. P-values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results

A total of 17 cryopreserved skull flaps (8 at − 23 °C; 9 at − 80 °C) obtained during DC between June 2019 and October 2020 as well as 2 CAD (1 vancomycin-soaked) were analyzed (Table 1). Median age of our cohort was 70 years, whereas 9 patients (53%) were male. 6 patients underwent a DC after severe TBI; 11 patients for a vascular disease like infarct or spontaneous bleeding. Median duration of DC was estimated at 125 min, no infections prior to DC were noticed, 17.6% of the skulls were fractured. Median duration of cryopreservation was 10.5 months (2–17 months).

No significant differences in the study group demographics (Group A: − 23 °C vs. B: − 80 °C) have been noticed. However, skull flaps were stored for a significant

Table 1 Study group demographics

Variable	− 23 °C	− 80 °C	P value
N	8	9	
Age (median, Q1; Q3)	67.5 (58; 77.5)	71 (53; 76)	n.s
Males	4 (50%)	5 (55.5%)	n.s
Traumatic Brain injury	2 (25%)	4 (44.5%)	n.s
Skull fracture	1 (12.5%)	2 (22.2%)	n.s
Preoperative infections prior to DC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	n.s
Duration of surgery (median, Q1, Q3)	129.5 (122; 210)	125 (120; 160)	n.s
Postoperative infections after DC	4 (50%)	4 (44.5%)	n.s

longer period at -23°C vs. -80°C (13.5 months vs. 7 months, $p=0.003$)

No microorganisms were detected at the normal bacterial culture. After active contamination of our skull flaps (A, B and C), all samples showed similar bacterial growth curve of above-mentioned pathogens.

Discussion

Despite the surgical simplicity of cranioplasty, this procedure is related to an unusually high rate of early and late complications up to 51% [11–13]. One of the most common complication is secondary bone infection (7–22%) [3, 14, 15]. Skull bone infections are still observed, even in the case of additional sterilization or various antimicrobial methods prior to reimplantations of the explanted cryostored skull flaps, like autoclaving. Fan et al. cryopreserved 989 bone flaps in liquid Nitrogen, thus -196°C , using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant, and still found an infection rate of 4.06% after cranioplasties. Wui et al. sterilized the at -70°C preserved explanted skull flaps additionally by autoclaving before reimplantation; nevertheless, an infection rate of 38.5% was documented [17]. Tahir et al. placed the at -26°C cryopreserved autologous bone flaps in a solution of normal saline, hydrogen peroxide and povidone iodine solution mixed with antibiotics before reimplantation but still 3.4% of the patients showed postoperative infections [18].

To date, several factors have been identified to associate with a higher probability of postoperative bone infection, namely younger age, reimplantation of multi-fragmented skull flaps, a ventriculoperitoneal shunt mandatory hydrocephalus, multiple skull operations or long cryopreservation of the explanted skull flaps [9, 19–22].

A suboptimal temperature during storage of the bone flap may also be speculated as a cause of increased risk for postoperative infections. Since large prospective clinical trials allow cryostorage of patients' material only at temperatures equally or lower than -80°C in order to limit the cell metabolic activities and therefore cell damage, some may also anticipate lower infection rates of reimplanted skull flaps, which have been preserved at -80°C rather than -23°C . Given the paucity of relevant prospective studies, only retrospective studies on patients' series are available to handle this theme. However, also these studies are not eligible to investigate for the optimal temperature of storage, since no statistically powerful comparisons between series treated at different institutes with disparate patterns of skull flaps storage are feasible due to the selection and treatment bias. Since no reasonable comparisons between series of different institutes can be made, the current literature simply documents postoperative infections after cranioplasties regardless of the chosen temperature of storage [23, 24]

A different approach to give more insights into the role of skull flaps storage in the risk of postoperative skull bone infections would be a direct analysis of the skull flaps themselves, i.e. whether the flaps are already infected or colonized priorly to their reimplantation. However, such studies have been published only sporadically. Chan et al. performed bacterial cultures on 18 explanted skull flaps, which were cryopreserved at -80°C for 4–55 months [10]; a positive bacterial growth was observed in 27.8% of the cases. Similarly, Cho et al. examined 47 explanted skull flaps, which were cryopreserved at -70°C for 9–161 months and carried out a bacterial culture without bacterial growth [23]. Bhaskar et al. examined 25 explanted skull flaps, which were cryopreserved at -20°C for more than 6 months and carried out the bacterial culture with a positive culture rate of 20% [24]. Noteworthy, none of the above studies have analyzed the infection potential of the explanted skull flaps after active contamination with specific microorganisms and of course all skull flaps studied were preserved at the same temperature.

To the best of our knowledge, there has been no analysis to date that compared the microbiological profile and infection potential of skull flaps stored at different temperatures at the same institution. Such a comparison would limit various sources of bias observed in studies conducted at different institutions; i.e. differences in the surgical management (indications and timing of DC and cranioplasty, surgical techniques, performance and surgeons) and in the patterns of storage (steps of material collection and sterilization, temperature and time of storage). In our study, we were able to conduct a bacterial culture of skull flaps explanted and preserved at the same institution with sole difference the store temperature (-23°C vs. -80°C). No differences of the bacterial growth have been observed. Furthermore, the above-mentioned differently cryopreserved skull flaps and CAD (subgroup C) were additionally compared for their infection potential, as their bone fragments were secondary contaminated in a suspension with specific pathogens; we similarly observed no differences of the growth patterns of pathogens between the subgroups.

In conclusion, our study failed to identify a different infectious behavior of skull flaps stored either at -23°C or -80°C . Large prospective studies are needed to shed more light on this topic.

Limitations

1. The retrospective nature of the study and the limited study population does not allow for far reaching conclusions. Larger prospective studies are needed.

2. Skulls flaps of group B were longer preserved than those of group A, however no bacterial growth has been observed in none of the groups.

Abbreviations

DC: Decompressive hemicraniectomy; *S.aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*; *C.acnes*: *Cutibacterium acnes*; CAD: Computer aided designed; MIQ: Microbiological infectious quality standard; MALDI-TOF MS: Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry; TBI: Traumatic brain injury; MCA: Middle cerebral artery.

Acknowledgements

The authors are grateful to Ms. Katja Gold and Ms. Denise Seckelmann for their technical assistance during the bacterial culture. The results of the current project form the doctoral thesis of RA

Author contributions

RA and KG conceived the idea, performed the literature research, designed the study protocol, thawed and prepared the bone fragments, obtained the ethics approval and drafted the manuscript. RA and AD performed the literature research, obtained the informed consent from the legal representatives as well as the clinical and demographic data of the patients. CR, PV and ABP designed and carried out the microbiological assays. AH performed the statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Approval obtained by Ethics Committee, Medical Association of Westfalen Lippe and University of Muenster, Gartenstrasse 210-214, 48147, Muenster, Germany on 14 September 2020. Ethics Approval: 2020-340-f-S.

Consent for publication

Informed consent for research and publication was obtained from the legal guardians of our patients, since all patients included in our study were expired.

Competing interests

The authors declare that they have no financial competing interests in this section.

Author details

¹Department of Neurosurgery, St Marien Academic Hospital Luenen, University of Muenster, K LW St. Paulus Corporation, Altstadtstrasse 23, 44532 Luenen, Germany. ²Medical School, Rheinische Friedrich-Wilhelms University of Bonn, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany. ³Department of Medical Microbiology, MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund, Balkenstrasse 17-19, 44137 Dortmund, Germany. ⁴Department of Psychiatry, LVR, University of Essen-Duisburg, Duisburg, Germany. ⁵Biostatistics and Medical Biometry, Medical School OWL, Bielefeld University, Universitätsstrasse 25, 33615 Bielefeld, Germany. ⁶Medical School, Westfaelische Wilhelms University of Muenster, Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Muenster, Germany. ⁷Medical School, University of Nicosia, 2408 Nicosia, Cyprus.

Received: 24 February 2022 Accepted: 20 April 2022

Published: 13 May 2022

References

1. El Ahmadieh TY, et al. Surgical treatment of elevated intracranial pressure: decompressive craniectomy and intracranial pressure monitoring. *Neurosurg Clin N Am*. 2013;24(3):375–91.
2. Bender A, et al. Early cranioplasty may improve outcome in neurological patients with decompressive craniectomy. *Brain Inj*. 2013;27(9):1073–9.
3. Dünisch P, et al. Risk factors of aseptic bone resorption: a study after autologous bone flap reinsertion due to decompressive craniotomy. *J Neurosurg*. 2013;118(5):1141–7.
4. Hutchinson PJ, et al. Decompressive craniectomy in traumatic brain injury the randomized multicenter RESCUEicp study (www.RESCUEicp.com). In: Hoff JT, Keep RF, Xi G, Hua Y, editors., et al., *Acta Neurochir Suppl*. Vienna: Springer; 2006. p. 17–20.
5. Geurts M, et al. Surgical decompression for space-occupying cerebral infarction: outcomes at 3 years in the randomized HAMLET trial. *Stroke*. 2013;44(9):2506–8.
6. Vahedi K, et al. Sequential-design, multicenter, randomized, controlled trial of early decompressive craniectomy in malignant middle cerebral artery infarction (DECIMAL Trial). *Stroke*. 2007;38(9):2506–17.
7. Baldo S, Tacconi L. Effectiveness and safety of subcutaneous abdominal preservation of autologous bone flap after decompressive craniectomy: a prospective pilot study. *World Neurosurg*. 2010;73(5):552–6.
8. Shoakazemi A, Flannery T, McConnell RS. Long-term outcome of subcutaneously preserved autologous cranioplasty. *Neurosurgery*. 2009;65(3):505–10.
9. Hng D, et al. Delayed cranioplasty: outcomes using frozen autologous bone flaps. *Craniofac Trauma Reconstr*. 2015;8(3):190–7.
10. Chan DYC, et al. Cryostored autologous skull bone for cranioplasty? A study on cranial bone flaps' viability and microbial contamination after deep-frozen storage at – 80 °C. *J Clin Neurosci*. 2017;42:81–3.
11. Chang V, et al. Outcomes of cranial repair after craniectomy. *J Neurosurg*. 2010;112(5):1120–4.
12. Schuss P, et al. Cranioplasty after decompressive craniectomy: the effect of timing on postoperative complications. *J Neurotrauma*. 2012;29(6):1090–5.
13. Lee L, et al. A retrospective analysis and review of an institution's experience with the complications of cranioplasty. *Br J Neurosurg*. 2013;27(5):629–35.
14. Aarabi B, et al. Outcome following decompressive craniectomy for malignant swelling due to severe head injury. *J Neurosurg*. 2006;104(4):469–79.
15. Honeybul S, Ho KM. Cranioplasty: morbidity and failure. *Br J Neurosurg*. 2016;30(5):523–8.
16. Becker K, Reinhard B, Christian E, Christof E, Anton H, Volkhard AJK, Joachim K, Andreas P, Cord Heinrich S, Ulrich V. Microbiological diagnosis of arthritis and osteomyelitis—Part 1. 2014 80.
17. Wui SH, et al. The autoclaving of autologous bone is a risk factor for surgical site infection after cranioplasty. *World Neurosurg*. 2016;91:43–9.
18. Tahir MZ, et al. Safety of untreated autologous cranioplasty after extracorporeal storage at – 26 degree celsius. *Br J Neurosurg*. 2013;27(4):479–82.
19. Brommeland T, et al. Cranioplasty complications and risk factors associated with bone flap resorption. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2015;23:75.
20. Cheah PP, et al. Autologous cranioplasty post-operative surgical site infection: does it matter if the bone flaps were stored and handled differently? *Malays J Med Sci*. 2017;24(6):68–74.
21. Schwarz F, et al. Cranioplasty after decompressive craniectomy: is there a rationale for an initial artificial bone-substitute implant? A single-center experience after 631 procedures. *J Neurosurg*. 2016;124(3):710–5.
22. Korhonen TK, et al. Quantitative and qualitative analysis of bone flap resorption in patients undergoing cranioplasty after decompressive craniectomy. *J Neurosurg*. 2018;130(1):312–21.

23. Cho TG, et al. Osteoblast and bacterial culture from cryopreserved skull flap after craniectomy: laboratory study. *J Korean Neurosurg Soc.* 2017;60(4):397–403.
24. Bhaskar IP, et al. Microbial contamination assessment of cryostored autogenous cranial bone flaps: should bone biopsies or swabs be performed? *Acta Neurochir (Wien).* 2013;155(2):367–71.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Article

Explant Skull Flaps after Decompressive Hemicraniectomy Demonstrate Relevant Bone Avitality-Is Their Reimplantation Worth the Risk?

Konstantinos Gousias ^{1,2,3,*}, Ingo Stricker ⁴, Annika Hoyer ⁵ , Theocharis Theocharous ¹, Csilla Rompf ⁶, Arthur B. Pranada ⁶, Andrea Tannapfel ⁴, Rachit Agrawal ^{1,†}  and Iris Tischoff ^{4,†}

¹ Department of Neurosurgery, Academic Hospital of University of Muenster, St. Marien Hospital Luenen, 44532 Luenen, Germany; drtheocharoust@gmail.com (T.T.); smarterachitag@gmail.com (R.A.)

² Medical School, Westfaelische Wilhelms University of Muenster, 48149 Muenster, Germany

³ Medical School, University of Nicosia, Nicosia 2408, Cyprus

⁴ Institute of Pathology, Ruhr University Bochum, 44789 Bochum, Germany; ingo.stricker@pathologie-bochum.de (I.S.); andrea.tannapfel@pathologie-bochum.de (A.T.); iris.tischoff@rub.de (I.T.)

⁵ Biostatistics and Medical Biometry, Medical School OWL, Bielefeld University, 33615 Bielefeld, Germany; annika.hoyer@uni-bielefeld.de

⁶ MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund, 44137 Dortmund, Germany; rompf@labmed.de (C.R.); apranada@labmed.de (A.B.P.)

* Correspondence: gousias.konstantinos@klinikum-luenen.de

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Gousias, K.; Stricker, I.; Hoyer, A.; Theocharous, T.; Rompf, C.; Pranada, A.B.; Tannapfel, A.; Agrawal, R.; Tischoff, I. Explanted Skull Flaps after Decompressive Hemicraniectomy Demonstrate Relevant Bone Avitality-Is Their Reimplantation Worth the Risk? *Brain Sci.* **2023**, *13*, 1277. <https://doi.org/10.3390/brainsci13091277>

Academic Editor: Gregory Hawryluk

Received: 11 August 2023

Revised: 26 August 2023

Accepted: 31 August 2023

Published: 1 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Reimplantations of autologous skull flaps after decompressive hemicraniectomies (DHs) are associated with high rates of postoperative bone flap resorption (BFR). We histologically assessed the cell viability of explanted bone flaps in certain periods of time after DH, in order to conclude whether precursors of BRF may be developed during their storage. Methods: Skull bone flaps explanted during a DH between 2019 and 2020 were stored in a freezer at either -23°C or -80°C . After their thawing process, the skulls were collected. Parameters of bone metabolism, namely PTH1 and OPG, were analyzed via immunohistochemistry. H&E stain was used to assess the degree of avital bone tissue, whereas the repeated assays were performed after 6 months. Results: A total of 17 stored skull flaps (8 at -23°C ; 9 at -80°C) were analyzed. The duration of cryopreservation varied between 2 and 17 months. A relevant degree of bone avitality was observed in all skull flaps, which significantly increased at the repeated evaluation after 6 months ($p < 0.001$). Preservation at -23°C ($p = 0.006$) as well as longer storage times ($p < 0.001$) were identified as prognostic factors for higher rates of bone avitality in a linear mixed regression model. Conclusions: Our novel finding shows a clear benefit from storage at -80°C , which should be carefully considered for the future management and storage of explanted skull flaps. Our analysis also further revealed a significant degree of bone avitality, a potential precursor of BFR, in skull flaps stored for several weeks. To this end, we should reconsider whether the reimplantation of autologous skull flaps instead of synthetic skull flaps is still justified.

Keywords: decompressive hemicraniectomy; skull bone flaps; storage; skull bone avitality; bone flap resorption

1. Introduction

Cranioplasty is defined as the reimplantation of either previously removed autologous skull flaps after a decompressive hemicraniectomy (DH) or implantation of a synthetic flap (SF) and is performed after regress of the malignant brain swelling at an interval of several weeks to months following DH [1,2]. Although the surgical procedure is regarded as one of the simplest in neurosurgery, it is associated with an unusually high rate of

early and/or secondary postoperative complications [1,3–7]. Overall cranioplasty related complications are significantly higher after the reimplantation of an autologous bone flap (ABF) compared to an SF, mostly because of the development of bone flap resorption (BFR), which is only seen after cranioplasty with ABFs [6,8]. BFR, which is also called aseptic bone necrosis or osteonecrosis, has been long recognized as the most common ABF-specific cranioplasty complication with an estimated pooled incidence of 15% to almost every second patient, according to recently published clinical systematic reviews [3,4,6,8]. Further specific volumetric studies on ABFs identified much higher rates of BFR, namely from 77 to 90% [9,10]. Spake et al. reported a rate of 82% for clinically relevant BRF depicted on cranial CT among their cohort, whereas BRF progressed over the years in a linear and continuous manner [11].

To date, several factors have been associated with a higher probability of postoperative BFR, namely younger age [1,3,10,12,13], reimplantation of multi-fragmented skull flaps after traumatic brain injury [1,3–5,12,13], multiple skull operations [3,8,12] or the longer duration of surgical procedures [3,12].

In order to identify further potential sources of secondary aseptic bone necrosis after ABF cranioplasty, in particular to answer the question whether the process of necrosis begins directly after the DH and is ongoing during the storage of the skull flaps and whether the temperature (−23 °C vs. −80 °C) and duration of storage may influence this procedure, we conducted our clinical trial DRKS00023283 (www.drks.de, accessed on 26 October 2020). In this regard, we carried out a histological analysis of the disparately cryopreserved skull flaps and assessed via H&E staining the degree of bone avitality, a precursor of aseptic bone necrosis, in two different periods of time after DH, namely at the initial index time and after 6 months. Further parameters of bone metabolism, namely parathyroid hormone 1 receptor (PTH1) and osteoprotegerin (OPG) were analyzed via immunohistochemistry.

2. Methods

2.1. Patients

The clinical trial DRKS00023283 (<http://www.drks.de>, accessed on 26 October 2020), aimed to clarify whether different patterns of storage of explanted skull flaps after DH, in particular storage at different degrees of °C, may prognosticate late complications after cranioplasty, among others infection and aseptic bone necrosis of the skull flap implants. To this end, we analyzed explanted skull flaps of only deceased adult patients, who underwent a DH for an acute malignant brain swelling in our department between June 2019 and October 2020. The trial was approved by the local ethics committee of the University of Muenster (ethic votum: 2020-340-f-S). Informed consent for inclusion in the research and publication was obtained by their legal representatives.

In our analysis, we included explanted skull flaps of 17 deceased patients; 8 skulls were preserved at −23 °C (group A) and 9 at −80 °C (group B). The specific parameters of demographics, surgical procedure and storage, i.e., age (years), sex (m/w), cause of malignant brain swelling (stroke vs. severe traumatic brain injury (sTBI)), additional skull fracture (yes/no), infection prior to DH (yes/no), duration of DH (minutes), duration (months) and temperature of storage (23 °C vs. −80 °C) were included as potential prognostic factors in our statistical analysis.

2.2. Material Collection, Patterns of Storage, Histological and Statistical Analysis

The skull bone flaps were explanted during a DH for a vascular disease, like infarct of arteria cerebri media (ACM) or sTBI between June 2019 and October 2020. After sterile packaging in triple plastic bags, the flaps were stored in a freezer at a temperature of either −23 °C (DHs between June and November 2019) or −80 °C (DHs between December 2019 and October 2020). The procedures of collecting and thawing the bone fragments (cortex and cancellous bone) were conducted as previously described [14].

At least five centrally located bone fragments per skull flap, sized approximately 0.5×0.5 cm, were collected in sterile tubes filled with formaldehyde solution. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens were decalcified and briefly, 1–2 micron-thin sections were cut and stained with H&E according to routine protocols. Immunostaining of PTH1R and OPG was performed using a Leica BOND-MAX autostainer and a Bond Polymer Refine Red Detection system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) according to the manufacturer's specifications. PTH1R and OPG polyclonal antibodies were used according to the manufacturer's protocols (PTH1R: Catalog PA1-20597, Invitrogen, dilution 1:200; OPG: bs-0431R, BIOSS). The immunoreactivity in the membrane for PTH1R and in cytoplasm for OPG was counted. The number of positive cells (osteoclasts, osteoblasts) in relation to all identified cells was documented. A Zeiss Light microscope (Zeiss Axio Imager.D2) was used for evaluation of PTH1R and OPG expression and H&E slides (Figure 1). Additionally, H&E slides were scanned via Light Microscope (Zeiss Axio Imager, Zeiss, Bochum, Germany. D2, Camera Zeiss AxioCam 506 color, Photography Zen2pro at 10–50 times magnification), whereas the degree of vitality in scanned H&E-stained images was calculated via Image J software, Version 1.53t. Avital tissue was defined as loss of osteocytes with empty osteocytic lacunae (Figure 1b). Empty osteocytic lacunae are a well-known histological sign for osteonecrosis and were detected and counted. Other known histological features for ischemia like ghosting in the fatty and haemopoietic marrow or proliferation of small vessels were only focally identified and not documented.

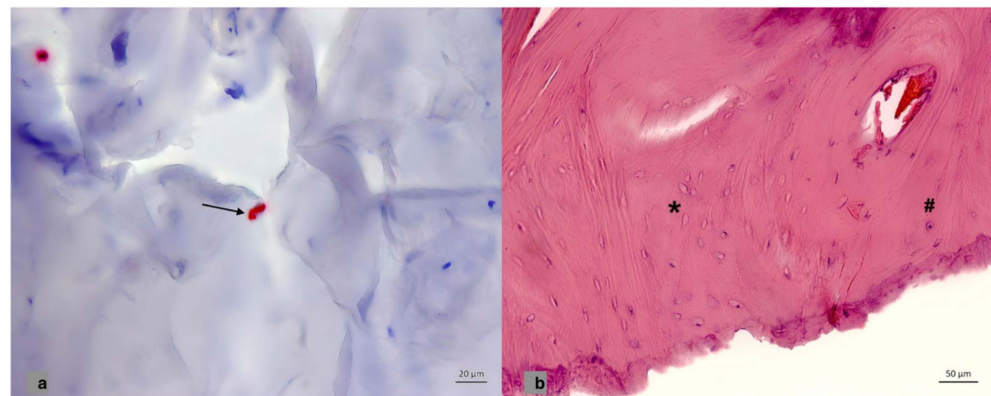


Figure 1. (a) Immunohistochemical staining in the cell membrane for PTH1R in bone fragments. Black arrow shows the expression for PTH1R in the cell membrane. (b) H&E staining of a bone fragment. The hashtag represents the normal osteocytes and the asterisk shows the empty osteocytic lacunae as a histological sign for osteonecrosis.

Wilcoxon tests were applied for comparisons between the group with bone flaps stored at -23 °C and the group with bone flaps stored at -80 °C. Log-linear mixed regression models with random intercept were used to account for repeated measures, i.e., expression of avital tissue of the same bone flaps, and to identify potential prognostic factors of bone avitality. According to this, the temperature of storage and time point of assessing avital areas were included as covariates. p -values < 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

A total of 18 stored skull flaps obtained during DHs between 2019 and 2020 were initially analyzed. After the exclusion of one outlier, 17 flaps remained for our analysis. Eight bone flaps were stored at -23 °C and nine at -80 °C. Nine patients (53%) were male. The median age of our cohort was 70 years; the median duration of cryopreservation was 10.5 months (2–17 months). The demographics of our cohort are shown in our previous publication [14].

The immunohistochemical staining was apparent in cell membrane and cytoplasm for PTH1R and OPG, respectively. The relative values (positive/all cells) per high power field (HPF) of PTH1 positive cells were comparable between our two subgroups, whereas OPG positive cells were more frequently observed in skull flaps stored at -23°C according to our univariate analysis (PTH1R relative counts/HPF at -23°C vs. at -80°C , median: 1.61% vs. 2.34%, $p = 0.923$; OPG relative counts/HPF at -23°C vs. at -80°C , median: 6.91% vs. 1.32%, $p = 0.039$) (Table 1). After adjustment via the Poisson model for possible confounders, namely gender and age, OPG expression remained significantly higher in the group A.

Table 1. Expression profile of PTH1R and OPG as well as the ratio of bone avitality in both groups.

Variable	-23°C	-80°C	p -Value
	Median, Quartiles (25th–75th Percentiles)	Median, Quartiles (25th–75th Percentiles)	
PTH1R	1.61% (0.91–4.46)	2.34% (0.99–4.76)	$p = 0.923$
OPG	6.91% (3.88–12.53)	1.32% (0.99–2.44)	$p = 0.039$
Avital areas	2.51% (1.19–4.36)	0.03% (0.00–0.09)	$p = 0.008$
Avital areas (repeated assays after 6 months)	13.16% (6.86–16.68)	8.34% (5.22–15.36)	$p = 0.470$

The relative ratio of avital/total tissue surface was estimated in all specimens of both groups at two different periods of time, namely in December 2020 and June 2021. Surprisingly, a relevant degree of bone avitality was identified in all skull flaps, even after storage for several weeks. After subgroup analysis, increased values of avital tissue were observed in skull flaps stored at -23°C vs. -80°C at the initial evaluation but not at the repeated analysis after 6 months. Initial evaluation, avital tissue/total tissue surface at -23°C vs. at -80°C , median: 2.51% vs. 0.03%, $p = 0.008$; repeated evaluation, avital tissue/total tissue surface at -23°C vs. at -80°C , median: 13.16% vs. 8.34%, $p = 0.470$. It is noteworthy that the comparisons of repeated vs. initial measures at both -23°C and -80°C , identified significantly higher values of avital areas after 6 months ($p < 0.001$).

Our univariate analysis identified the prolonged storage of the skull flaps as a significant predictor of avital tissue ($p < 0.001$). Further epidemiologic and clinical factors, like age, sex, cause of malignant brain swelling (stroke vs. sTBI), additional skull fracture, infection prior to DH or the surgical duration of DH were not associated with the relative ratio of avital tissue. Our linear mixed regression model identified storage at -23°C ($p = 0.006$) as well as longer storage times ($p < 0.001$) as independent prognostic factors for higher rates of bone avitality (Table 2).

Table 2. Results (fixed effects) from the log-linear mixed model with random intercept.

Variable	Regression Coefficients β (95% Confidence Interval)	$\exp(\beta)$ (95% Confidence Interval)	p -Value
Group (-23°C vs. -80°C)	2.77 (0.93; 4.60)	15.96 (2.53; 99.48)	0.006
Time (initial time point vs. 6 months later)	−4.26 (−6.09; −2.43)	0.01 (0.00; 0.09)	<0.001

4. Discussion

Cranioplasty, although technically easily feasible, carries an extremely high rate of short term or secondary complications, the most severe of which are surgical site infection as well as aseptic bone necrosis with consequent bone autolysis [1,4,6,8,12,15,16]. Multiple and long-lasting surgeries, severe traumatic brain injury with fragmented skull flaps, younger age as well as comorbidities like hydrocephalus have been identified as prognosticators for secondary complications after cranioplasty [1,3,4,17].

Whether different patterns of skull flap storage may influence the course of the disease is disputable [14,18–20]. In this regard, we conducted our clinical trial DRKS00023283 [21], which aimed to clarify, among other things, whether storage at different degrees of °C, may prognosticate late complications after cranioplasty, such as infection and aseptic bone necrosis of the skull flap implants. In a first step, we performed sterile bacterial cultures as well as cultures after contamination with specific pathogens and showed similar microbiological behavior and infection potential of skull flaps stored at different temperatures [14]. In order to conclude our second endpoint, namely the involvement of patterns of storage in the course of aseptic bone necrosis, we carried out the present histopathological study.

Aseptic bone necrosis is observed only after cranioplasty with ABFs, a fact that results in higher overall complications after ABF rather than SF cranioplasty [6,8]. To this end, a relevant shift in the surgical management of the disease and the choice of material for cranioplasty has been already initiated; SFs are increasingly replacing ABFs for cranioplasties [5,6,13,22,23].

To date, we are aware that younger age [1,3,10,12,13], traumatic brain injury [4,17], size and thickness [24,25], reimplantation of multiple bone fragments [1,3,12,13] and surgical site infection [5] are well established prognostic factors for the development of aseptic bone necrosis [3,4,16,17]. The subsequent bone lysis may in turn initiate issues regarding cosmesis, protection, cranioplasty failure and reoperation as well as rare situations, like sinking skin syndrome [3,16,26]. Our current histological analysis aims particularly to answer the question whether the process of necrosis is already apparent and ongoing during the storage of the skull flaps and whether the temperature (−23 °C vs. −80 °C) and duration of storage may influence this procedure. To this end, we recognized unusually high rates of avital tissue areas in our explanted skull flaps compared to reference values for bone. Further, those skull flaps being stored for a longer period of time as well as those stored at −23 °C expressed significantly higher bone avitality. A repeated analysis of the same skull flap after 6 months showed even higher values of bone avitality.

The potential association of a longer duration of storage and reduced viability of a biological material has been discussed before [27]. Although, cryopreservation at −80 °C is in principle thought to preserve the viability and function of living cells and tissues for a long period of time, since cells enter into the phase of quiescence, a lethargic living state characterized by low metabolism [28,29], there are some research groups that report diminished viability of biological materials after longer durations of storage [16,18,27]. Sugimoto et al. analyzed the bone differentiation and proliferation capacities of 15 samples of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells after cryopreservation of 1 to 20 years and found an inverse correlation between the proportion of viable cells and the number of years of cryopreservation [27]. Bhaskar et al. conducted bone studies on explanted skull flaps supporting the notion that skull flaps stored at −30 °C for more than 6 months are not viable [18]. Chan et al. conducted an osteoblast culture on 18 skull flaps stored at −80 °C for 4 to 55 months and found no viable osteoblast population [30]. A similar osteoblast culture was performed on 47 skull flaps stored at −70 °C for 9 to 161 months without identification of viable osteoblast growth [31].

Whereas the possible relationship between a longer duration of storage and reduced bone viability has previously been speculated on, no associations between the temperature of storage and bone viability have been reported, yet. Our study provides novel robust data about the superiority of storage at −80 °C rather than −23 °C, which appears to be a more protective method of storage against the development of avital tissue, perhaps due to the entrance of the cell into quiescence. The design of our study, i.e., the direct comparison of storage at −23 °C vs. −80 °C for the first time at the same institution following the same management protocols (indications for DH and CP as well as surgical technique, timing of CP, preparation and remaining storage patterns of ABFs, etc.) allows for such far reaching conclusions, since it eliminates the selection bias which would be apparent if similar studies had been performed at various institutes at different locations. To date, we lack established

protocols regarding the optimal storage of explanted skull flaps after DH [15,19]. ABFs are kept frozen at various temperatures mainly from -20°C to -80°C [19]. Our novel finding shows the clear benefit of storage at -80°C and should be carefully considered for the future management and storage of ABFs.

PTH1R and OPG, two key players of bone metabolism, were additionally analyzed in our study. Increased PTH1R expression promotes the bone resorption rate via the activation of osteoclasts, whereas OPG protects the bone from resorption by binding to RANKL and TRAIL, thus inhibiting osteoclastogenesis [30]. The low levels of PTH1R and OPG observed in our study reflect a dramatically diminished but still present bone metabolism, as a consequence of cell freezing. In accordance with the notion that ABF cells stored at -80°C demonstrate decreased metabolism, they also express lower OPG levels.

Synoptically, the current surgical management of cranioplasties includes implantation of both ABFs as well as SFs, according to each institute's policy. Although, SFs are increasingly replacing ABFs, in particular in younger patients, after traumatic brain injury with multiple bone fragments, ABFs are still used mainly due to their lower costs [5,6]. A secure statement whether the reimplanted ABFs are viable or not is not possible. Even if some researchers failed to extract osteoblast from cultures of ABFs stored for an extremely long time [30–33], no data have yet been published for ABFs frozen only for several months. Furthermore, we cannot exclude that ABFs that appear non-viable at the time of their thaw, will undergo bone remodeling secondarily after their reimplantation and gain viability later. Our microscopical analysis did evaluate such ABFs, i.e., stored for several weeks or some months, and revealed relevant but not life restrictive modifications of the cell microarchitecture, as also supported by similar studies in fibular and rabbit models [34,35]. Further, these results are in line with the conclusions of Goettsche et al. [36]. They recently performed a histological analysis of osseous samples from aseptic bone necrosis of 11 ABFs, which had been stored after DH at -80°C , reimplanted to the individuals and again explanted in the context of aseptic necrosis. The mean time between reimplantation of ABFs after DH and re-explantation of ABFs due to necrosis was more than 12 months, which left sufficient time for potential bone regeneration [36]. Although their microscopical investigation showed prominent structural changes, like loss of differentiation of cortical and cancellous bone, they still observed remodeling in terms of a build-up of vital bone tissue in some areas of bone. However, they also describe, in the tissue of the aseptic bone necrosis, high rates of avital osteocyte cavities, as we also do, and predominantly fibrotic and necrotic marrow spaces. Avital osteocytes are linked to local BRF, since the necrotic tissue recruits osteoclasts to engulf the apoptotic osteocytes and initiate bone autolysis [37–40].

Therefore, our study demonstrates that the reimplanted ABF may initially function as a biocompatible scaffold with minimal or no cell viability. However, the presence of adjacent healthy bone tissue could potentially stimulate bone regeneration (referred to as osteoconduction). The extensive presence of avital osteocytes though, which are inductors of osteoclast-regulated resorption, may act as source of bone regeneration failure and hinder graft incorporation leading to aseptic bone necrosis and bone lysis.

Our study is subject to various limitations, such as its retrospective character and the limited quantity of studied material, hindering a robust statistical analysis, which however are attributed to the nature of the disease. The present clinical trial, though, includes for the first time a direct unbiased comparison of different methods (temperature) of freezing for explanted skull flaps as well as an analysis of their bone metabolisms and bone cell architecture.

5. Conclusions

With regard to our new findings, we should think carefully before we reimplant ABFs that demonstrate high rates of avital areas. In our study, ABFs stored at -23°C and for long periods of time >3 months, showed unusually high bone avitality, thus should preferentially not be used as material for cranioplasty and SFs should be implanted instead. Further, we should carefully reconsider whether reimplantations of ABFs in general are worth their

high risk of aseptic bone necrosis with all their consequences, since according to our results avital tissue, even in smaller amounts, is already developed also in ABFs cryostored for only several weeks.

Author Contributions: Conceptualization, R.A., K.G. and I.S.; data curation, A.H.; formal analysis, R.A., A.H. and I.T.; investigation, R.A., I.S., C.R., A.B.P., I.T. and T.T.; methodology, R.A., K.G. and C.R.; project administration, K.G. and A.T.; resources, T.T.; supervision, I.S. and A.T.; validation, A.B.P., I.T. and A.T.; writing—original draft, R.A.; writing—review and editing, K.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and ethics approval and consent to participate obtained from the Ethics Commission, Medical Association of Westfalen Lippe and University of Muenster, Gartenstrasse 210-214, 48147, Muenster, Germany on 14 September 2020. File Number: 2020-340-f-S.

Informed Consent Statement: As all the patients included in this study were expired, we obtained consent for research and publication from their legal guardians via our institutional consent form.

Data Availability Statement: Supporting research data will be available upon request.

Acknowledgments: The authors are grateful to Margret Kochem and Magieda Ayyad for their technical assistance during the histological assays.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

CP	Cranioplasty
DH	Decompressive hemicraniectomies
BFR	Bone flap resorption
DRKS	Deutsches Register Klinischer Studien (German Clinical Trials Register)
PTH1	Parathyroid hormone 1 receptor
OPG	Osteoprotegerin
H&E	Hematoxylin and Eosin
SF	Synthetic flap
ABF	Autologous bone flap
CT	Computer tomography
°C	Celsius
sTBI	Severe traumatic brain injury
ACM	Arteria cerebri media
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
HPF	High power field
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand

References

1. Mee, H.; Anwar, F.; Timofeev, I.; Owens, N.; Grieve, K.; Whiting, G.; Alexander, K.; Kendrick, K.; Helmy, A.; Hutchinson, P.; et al. Cranioplasty: A Multidisciplinary Approach. *Front. Surg.* **2022**, *9*, 864385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Alkhaibary, A.; Alharbi, A.; Alnefaie, N.; Oqalaa Almubarak, A.; Aloraidi, A.; Khairy, S. Cranioplasty: A Comprehensive Review of the History, Materials, Surgical Aspects, and Complications. *World Neurosurg.* **2020**, *139*, 445–452. [[CrossRef](#)]
3. Signorelli, F.; Giordano, M.; Caccavella, V.M.; Ioannoni, E.; Gelormini, C.; Caricato, A.; Olivi, A.; Montano, N. A systematic review and meta-analysis of factors involved in bone flap resorption after decompressive craniectomy. *Neurosurg. Rev.* **2022**, *45*, 1915–1922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Shepetovsky, D.; Mezzini, G.; Magrassi, L. Complications of cranioplasty in relationship to traumatic brain injury: A systematic review and meta-analysis. *Neurosurg. Rev.* **2021**, *44*, 3125–3142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Do, T.H.; Lu, J.; Palzer, E.F.; Cramer, S.W.; Huling, J.D.; Johnson, R.A.; Zhu, P.; Jean, J.N.; Howard, M.A.; Sabal, L.T.; et al. Rates of operative intervention for infection after synthetic or autologous cranioplasty: A National Readmissions Database analysis. *J. Neurosurg.* **2022**, *138*, 514–521. [[CrossRef](#)]

6. Gerstl, J.V.E.; Rendon, L.F.; Burke, S.M.; Doucette, J.; Mekary, R.A.; Smith, T.R. Complications and cosmetic outcomes of materials used in cranioplasty following decompressive craniectomy—a systematic review, pairwise meta-analysis, and network meta-analysis. *Acta Neurochir.* **2022**, *164*, 3075–3090. [CrossRef] [PubMed]
7. Honeybul, S.; Ho, K.M. Cranioplasty: Morbidity and failure. *Br. J. Neurosurg.* **2016**, *30*, 523–528. [CrossRef]
8. Malcolm, J.G.; Mahmooth, Z.; Rindler, R.S.; Allen, J.W.; Grossberg, J.A.; Pradilla, G.; Ahmad, F.U. Autologous Cranioplasty is Associated with Increased Reoperation Rate: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg.* **2018**, *116*, 60–68. [CrossRef]
9. Lee, J.H.; Chough, C.K.; Choi, H.J.; Ko, J.K.; Cho, W.H.; Cha, S.H.; Choi, C.H.; Kim, Y.H. Bone Flap Changes after Cranioplasty Using Frozen Autologous Bone Flaps: A Three-Dimensional Volumetric Reconstruction Study. *Yonsei Med. J.* **2019**, *60*, 1067–1073. [CrossRef]
10. Korhonen, T.K.; Salokorpi, N.; Niinimäki, J.; Serlo, W.; Lehenkari, P.; Tetri, S. Quantitative and qualitative analysis of bone flap resorption in patients undergoing cranioplasty after decompressive craniectomy. *J. Neurosurg.* **2018**, *130*, 312–321. [CrossRef]
11. Spake, C.S.; Goli, R.; Beqiri, D.; Crozier, J.W.; Cielo, D.J.; Klinge, P.M.; Svokos, K.; Woo, A.S. Evidence of Linear Bone Flap Resorption in Patients Undergoing Autologous Cranioplasty Following Decompressive Craniectomy: A 3D Slicer Segmented Analysis of Serial Computed Tomography Images. *World Neurosurg.* **2022**, *164*, e799–e807. [CrossRef] [PubMed]
12. Brommeland, T.; Rydning, P.N.; Pripp, A.H.; Helseth, E. Cranioplasty complications and risk factors associated with bone flap resorption. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* **2015**, *23*, 75. [CrossRef] [PubMed]
13. Schwarz, F.; Dunisch, P.; Walter, J.; Sakr, Y.; Kalff, R.; Ewald, C. Cranioplasty after decompressive craniectomy: Is there a rationale for an initial artificial bone-substitute implant? A single-center experience after 631 procedures. *J. Neurosurg.* **2016**, *124*, 710–715. [CrossRef]
14. Agrawal, R.; Rompf, C.; Pranada, A.B.; Vollmar, P.; De Lorenzo, A.; Hoyer, A.; Gousias, K. Microbiological profile and infection potential of different cryopreserved skull flaps after decompressive hemispheric craniectomy. Is cryopreservation at −80 better? *BMC Res. Notes* **2022**, *15*, 167. [CrossRef]
15. Melin, S.; Haase, I.; Nilsson, M.; Claesson, C.; Osthölm Balkhed, A.; Tobieson, L. Cryopreservation of autologous bone flaps following decompressive craniectomy: A new method reduced positive cultures without increase in post-cranioplasty infection rate. *Brain Spine* **2022**, *2*, 100919. [CrossRef] [PubMed]
16. Schuss, P.; Vatter, H.; Oszvald, Á.; Marquardt, G.; Imöhl, L.; Seifert, V.; Güresir, E. Bone flap resorption: Risk factors for the development of a long-term complication following cranioplasty after decompressive craniectomy. *J. Neurotrauma* **2013**, *30*, 91–95. [CrossRef] [PubMed]
17. Dobran, M.; Nasi, D.; Polonara, G.; Paracino, R.; Mancini, F.; Della Costanza, M.; Jonis, G.; Campa, S.; Lattanzi, S.; Iacoangeli, M. Clinical and radiological risk factors of autograft cranioplasty resorption after decompressive craniectomy for traumatic brain injury. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2020**, *196*, 105979. [CrossRef]
18. Bhaskar, I.P.; Yusheng, L.; Zheng, M.; Lee, G.Y. Autogenous skull flaps stored frozen for more than 6 months: Do they remain viable? *J. Clin. Neurosci.* **2011**, *18*, 1690–1693. [CrossRef]
19. Mirabet, V.; Garcia, D.; Yague, N.; Larrea, L.R.; Arbona, C.; Botella, C. The storage of skull bone flaps for autologous cranioplasty: Literature review. *Cell Tissue Bank.* **2021**, *22*, 355–367. [CrossRef]
20. Inamasu, J.; Kuramae, T.; Nakatsukasa, M. Does difference in the storage method of bone flaps after decompressive craniectomy affect the incidence of surgical site infection after cranioplasty? Comparison between subcutaneous pocket and cryopreservation. *J. Trauma* **2010**, *68*, 183–187; discussion 187. [CrossRef]
21. Deutsches Register Klinischer Studien. Available online: <https://drks.de/search/de/results> (accessed on 19 January 2023).
22. Beri, A., Jr.; Pisulkar, S.G.; Bansod, A.V.; Dahihandekar, C. Paradigm Shift in Materials for Skull Reconstruction Facilitated by Science and Technological Integration. *Cureus* **2022**, *14*, e28731. [CrossRef] [PubMed]
23. Johnston, D.T.; Lohmeier, S.J.; Langdell, H.C.; Pyfer, B.J.; Komisarow, J.; Powers, D.B.; Erdmann, D. Current Concepts in Cranial Reconstruction: Review of Alloplastic Materials. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* **2022**, *10*, e4466. [CrossRef] [PubMed]
24. Akdag, U.B.; Ogut, E.; Barut, C. Intraforaminal Dural Septations of the Jugular Foramen: A Cadaveric Study. *World Neurosurg.* **2020**, *141*, e718–e727. [CrossRef] [PubMed]
25. Ogut, E.; Armagan, K.; Barut, C. Reappraisal of the types of trigeminal porus and importance in surgical applications. *Surg. Radiol. Anat.* **2021**, *43*, 1169–1178. [CrossRef] [PubMed]
26. Rohringer, C.R.; Rohringer, T.J.; Jhas, S.; Shahideh, M. Sinking skin flap syndrome in a patient with bone resorption after cranioplasty and ventriculoperitoneal shunt placement: Illustrative case. *J. Neurosurg. Case Lessons* **2021**, *2*, CASE21359. [CrossRef]
27. Sugimoto, Y.; Yamazaki, Y.; Moriyama, K.; Sugimoto, T.; Kumazawa, K.; Baba, K.; Sone, Y.; Takeda, A. Differentiation and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation Comparison among cells stored for 1, 5, 10, 15, and 20 years. *Regen. Ther.* **2021**, *18*, 363–371. [CrossRef]
28. Hernández-Tapia, L.G.; Föhlerová, Z.; Židek, J.; Alvarez-Perez, M.A.; Čelko, L.; Kaiser, J.; Montufar, E.B. Effects of Cryopreservation on Cell Metabolic Activity and Function of Biofabricated Structures Laden with Osteoblasts. *Materials* **2020**, *13*, 1966. [CrossRef]
29. Pegg, D.E. Principles of cryopreservation. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1257*, 3–19. [CrossRef]

30. Chan, D.Y.C.; Mok, Y.T.; Lam, P.K.; Tong, C.S.W.; Ng, S.C.P.; Sun, T.F.D.; Poon, W.S. Cryostored autologous skull bone for cranioplasty? A study on cranial bone flaps' viability and microbial contamination after deep-frozen storage at -80°C . *J. Clin. Neurosci.* **2017**, *42*, 81–83. [[CrossRef](#)]
31. Cho, T.G.; Kang, S.H.; Cho, Y.J.; Choi, H.J.; Jeon, J.P.; Yang, J.S. Osteoblast and Bacterial Culture from Cryopreserved Skull Flap after Craniectomy: Laboratory Study. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **2017**, *60*, 397–403. [[CrossRef](#)]
32. Gunsser, J.; Hermann, R.; Roth, A.; Lupp, A. Comprehensive assessment of tissue and serum parameters of bone metabolism in a series of orthopaedic patients. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0227133. [[CrossRef](#)]
33. Mirabet, V.; García, D.; Roca, A.; Quiroz, A.R.; Antón, J.; Rodríguez-Cadarso, M.; Ocete, D.; Aranda, L.; Melero, A.; Guillot, A.J.; et al. Cranioplasty with Autologous Bone Flaps Cryopreserved with Dimethylsulphoxide: Does Tissue Processing Matter. *World Neurosurg.* **2021**, *149*, e582–e591. [[CrossRef](#)]
34. Andrade, M.G.; Sa, C.N.; Marchionni, A.M.; dos Santos Calmon de Bittencourt, T.C.; Sadigursky, M. Effects of freezing on bone histological morphology. *Cell Tissue Bank.* **2008**, *9*, 279–287. [[CrossRef](#)]
35. Shaw, J.M.; Hunter, S.A.; Gayton, J.C.; Boivin, G.P.; Prayson, M.J. Repeated freeze-thaw cycles do not alter the biomechanical properties of fibular allograft bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2012**, *470*, 937–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Götsche, J.; Mende, K.C.; Schram, A.; Westphal, M.; Amling, M.; Regelsberger, J.; Sauvigny, T.; Hahn, M. Cranial bone flap resorption-pathological features and their implications for clinical treatment. *Neurosurg. Rev.* **2021**, *44*, 2253–2260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Davis, H.M.; Valdez, S.; Gomez, L.; Malicky, P.; White, F.A.; Subler, M.A.; Windle, J.J.; Bidwell, J.P.; Bruzzaniti, A.; Plotkin, L.I. High mobility group box 1 protein regulates osteoclastogenesis through direct actions on osteocytes and osteoclasts in vitro. *J. Cell Biochem.* **2019**, *120*, 16741–16749. [[CrossRef](#)]
38. Plotkin, L.I. Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2014**, *12*, 121–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Aguirre, J.I.; Plotkin, L.I.; Stewart, S.A.; Weinstein, R.S.; Parfitt, A.M.; Manolagas, S.C.; Bellido, T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J. Bone Miner. Res.* **2006**, *21*, 605–615. [[CrossRef](#)]
40. Verborgt, O.; Gibson, G.J.; Schaffler, M.B. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **2000**, *15*, 60–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3 Danksagung

Ich möchte allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen. Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Clin. Prof. Dr. Dr. med. Konstantinos Gousias, für seine ausgezeichnete Betreuung, seine vielfältige geduldige Unterstützung und wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der gesamten Arbeit bedanken. Ein sehr herzlicher Dank gilt meiner Familie, welche auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.