

Diplomarbeit

ENTWICKLUNG EINES GENERATIVEN VERFAHRENS UND NEUER POLYMER-COMPOUNDS FÜR PERSONALISIERTE SCHÄDEL- UND GESICHTSIMPLANTATE

eingereicht von
Alois Anton Tax

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ)
an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der
**Universitätsklinik für Neurochirurgie -
Forschungseinheit experimentelle Neurotraumatologie**

unter der Anleitung von Betreuerin
Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ rer.nat Ute Schäfer

Graz am 22.05.2016

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz am 22.05.2016

Alois Anton Tax eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber allen Personen, die mich in der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben, zum Ausdruck bringen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ rer. nat. Ute Schäfer und Herrn Univ.-Ass. Dr. med. Gord von Campe für die Möglichkeit und das Vertrauen, an dem Projekt mitwirken zu dürfen. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Muammer Ücal für die Einführung in dieses Thema, sämtliche Hilfestellungen und die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Meine Anerkennung gebührt Frau Mag.^a (FH) Ulrike Zefferer für die organisatorische Unterstützung.

Vielen Dank an meine Partnerin und alle Freunde, die bereitwillig ihre wertvolle Zeit aufgebracht haben, um mich auf unterschiedliche Weise zu unterstützen.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern für den fortwährenden Beistand bedanken.

Zusammenfassung

HINTERGRUND: Die Anwendung kommerziell erhältlicher patientenspezifischer Implantate (PSI) ist kostenintensiv und bietet den Nachteil einer Zweitoperation. Fortschreitende Entwicklungen auf dem Gebiet der Fertigungs- und Kunststofftechnik ermöglichen hingegen eine Herstellung durch die anwendende Person selbst. Diese Studie untersucht die Prozessgestaltung, um den Einsatz intraoperativ gefertigter, personalisierter Schädel und- Gesichtsimplantate künftig zu ermöglichen.

METHODEN: In einer prospektiven Interventionsstudie wurde die Anwendbarkeit FDM (fused deposition modeling)-gedruckter Implantate an 20 männlichen Sprague Dawley® Ratten untersucht. Anhand hochauflösender CT-Bilder zuvor kraniotomierter Ratten wurde jeweils ein virtuelles Knochenmodell des Defekts erstellt. Mittels eigens entwickeltem Verfahren erfolgte die Rekonstruktion der Läsion durch *Computer-aided Design* (CAD). Die spezifischen Implantate wurden durch einen Spezialdrucker gefertigt und nach Dampfsterilisation in den Defekt eingesetzt. Der erste Beobachtungszeitraum betrug fünf, der zweite 14 Tage. Die physikalischen und immunologischen Eigenschaften der Implantate werden in den Folgeuntersuchungen analysiert.

RESULTATE: Für die Erstellung der Druckvorlage wurden 51 Minuten und 54 Sekunden benötigt. Die Fertigung des Knochenersatzes konnte in allen Fällen erfolgreich durchgeführt werden. Sämtliche Implantate verfügten über eine zufriedenstellende Passgenauigkeit und bedurften keiner weiteren Modifikation. Im Zuge der Kraniotomie wurde die Dura Mater dreier Tiere verletzt. Postoperativ zeigten sich keine schwerwiegenden Komplikationen.

CONCLUSIO: Die durchgeführten Untersuchungen legen eine Eignung des vorgestellten Prozesses nahe. In weiterer Folge muss eine Software entwickelt werden, um den Vorgang automatisiert abzuwickeln.

SCHLAGWORTE: • 3D-Modellierung • 3D-Druck • fused deposition modeling • rapid prototyping • patientenspezifische Implantate • Kranioplastie • Schädel- und Gesichtschirurgie

Abstract

BACKGROUND: The use of commercially available patient-specific implants (PSI) is costly and presents the disadvantage of a second operation. Progressive developments in the field of manufacturing and plastic technology allow production by the practitioners themselves. This study examines the design process to enable the use of intraoperatively crafted, personalized cranio-facial implants in future times.

METHODS: In a prospective intervention study the applicability of FDM- (fused deposition modeling) printed implants was examined in 20 male Sprague Dawley® rats. A virtual bone model of the defect was created using high-resolution CT images of rats who previously underwent craniotomy. The reconstruction of the lesion was performed with a special procedure using computer-aided design (CAD). Specific implants were manufactured with a special printer and fitted into the defect after steam sterilisation. The first period of observation was 5, the second 14 days. The physical and immunological properties of the implants will be analyzed in subsequent examinations.

RESULTS: Creation of the template took 51 minutes and 54 seconds. The production of the bone replacement was successfully performed in all cases. All implants fitted accurately and needed no further modification. During the craniotomy, the dura mater of three animals was injured. Postoperatively no serious complications were observed.

CONCLUSIO: The investigations suggest suitability of the proposed process. Subsequently a software must be designed to handle the process automatically.

KEY-WORDS: • 3D-modeling • additive manufacturing • fused deposition modeling • rapid prototyping • patient specific implants • cranioplasty • craniofacial surgery

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNISSE	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
HAUPTTEIL	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 HINTERGRUND.....	2
1.2 3D DRUCK.....	4
1.3 KUNSTSTOFFE.....	6
1.4 PROBLEMSTELLUNG.....	7
2 MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 STUDIENDESIGN.....	9
2.2 PROZESSENTWICKLUNG.....	10
2.2.1 <i>Implantatevaluierung</i>	11
2.3 VERSUCHSTIERE.....	12
2.4 VERBRAUCHSMATERIAL.....	13
2.5 VERSUCHSAUFBAU.....	14
2.5.1 <i>Operationsmethoden</i>	14
2.5.1.1 Kraniotomie.....	16
2.5.1.2 Reimplantation.....	17
2.5.1.3 Self-Implant.....	18
2.5.2 <i>Kontrollgruppen</i>	19
2.5.2.1 Healthy Control.....	19
2.5.2.2 Glue-Control.....	19
2.5.2.3 Anaesthesie- Kontrolle.....	19
2.5.3 <i>Postinterventionelle Versorgung</i>	20
2.5.4 <i>Bildgebung</i>	21
2.6 DIGITALISIERUNG UND MODELLERSTELLUNG.....	21
2.6.1 <i>3D Knochenmodell</i>	21
2.6.2 <i>Mesh-Modellierung</i>	22
2.7 IMPLANTATANFERTIGUNG.....	26
2.7.1 <i>3D-Druck</i>	26

2.7.2	<i>Implantataufbereitung</i>	26
2.8	DATENERHEBUNG UND ANALYSE	27
2.8.1	<i>Euthanasie & Organentnahme</i>	27
2.8.2	<i>Mikrotomie und Immunhistochemische Färbungen</i>	27
2.8.3	<i>Operationsprotokoll</i>	28
2.8.4	<i>Quantitative Auswertung</i>	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	DIGITALISIERUNG UND IMPLANTATGESTALTUNG	29
3.1.1	<i>Modellerstellung</i>	29
3.1.1.1	Einzeitige Bildgebung	30
3.1.1.2	Zweizeitige Bildgebung	32
3.1.2	<i>Modellierungsmethoden</i>	34
3.1.2.1	Methode 1: Mirror	34
3.1.2.2	Methode 2: Cage	35
3.1.2.3	Methode 3: Pre/Post	35
3.1.2.4	Finishing der Methoden	36
3.1.3	<i>Methodenwahl</i>	38
3.1.3.1	Dauer	38
3.1.3.2	Unterschiede	39
3.1.4	<i>Implantatevaluierung</i>	39
3.1.5	<i>Finale Implantatgestaltung</i>	40
3.1.5.1	Gestaltungsdauer	41
3.1.5.2	Speicherplatzbedarf	41
3.2	VERSUCHSVERLAUF	43
3.2.1	<i>Kontrollgruppe</i>	43
3.2.2	<i>Operationsverlauf</i>	43
3.3	KLINISCHER VERLAUF	45
3.3.1	<i>Fünf Tage Follow-Up</i>	46
3.3.2	<i>Zwei Wochen Follow-Up</i>	47
4	DISKUSSION	48
	LITERATURVERZEICHNIS	55

Verzeichnisse

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1 – FUSED DEPOSITION MODELING.....	5
ABBILDUNG 2.1 - OPERATIVE INTERVENTIONEN	16
ABBILDUNG 2.2 - KNOCHENMODELL.....	22
ABBILDUNG 2.3 – AUSRICHTUNG DES KNOCHENMODELLS	23
ABBILDUNG 2.4 – SCHRITTWEISE IMPLANTATGESTALTUNG	25
ABBILDUNG 3.1 - ERSTELLUNG DES KNOCHENMODELLS.....	30
ABBILDUNG 3.2 – SEGMENTIERUNGSVORGANG.....	31
ABBILDUNG 3.3 - VERGLEICH DER SCHWELLENWERTE.....	32
ABBILDUNG 3.4 – METHODE 1: MIRROR	34
ABBILDUNG 3.5 - METHODE 2: CAGE	35
ABBILDUNG 3.6 - METHODE 3: PRE/POST.....	36
ABBILDUNG 3.7 – IMPLANTATRÄNDER.....	36
ABBILDUNG 3.8 - VERGLEICH DER MODELLIERUNGSMETHODEN	37
ABBILDUNG 3.9 - TRANSLATIONSDAUER.....	38
ABBILDUNG 3.9 – IMPLANTATEVALUIERUNG	40
ABBILDUNG 3.11 - BOXPLOT: BANDBREITE DER GESTALTUNGSDAUER.....	41
ABBILDUNG 3.12– EXTRAKTION DES INFORMATIONSGEHALTS	42
ABBILDUNG 3.13 - PASSGENAUIGKEIT.....	44
ABBILDUNG 3.14 - KÖRPERMASSE VOR UND NACH DER INTERVENTION	45

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1 – AUFLISTUNG DER OPERATIONSMA TERIALEN	13
TABELLE 3.1 – ERSTELLUNG DER KNOCHENMODELLE PRE/POST IN 3D-SLICER.....	33
TABELLE 3.2 - GEGENÜBERSTELLUNG DER MODELLIERUNGSMETHODEN:	39
TABELLE 4.1 - HÄUFIGKEIT BIFRONTALER/-LATERALER KRANIOTOMIEN	52

Abkürzungsverzeichnis

A

AAN. *Anexate®*, *Antisedan®*, *NaCl-Lösung (0,9%)*
AC. *anaesthesia control*
AM. *additive manufacturing*

B

bzw.. *beziehungsweise*

C

CAD. *Computer-aided Design*
CAM. *Computer-aided Manufacturing*
CH₂O. *Formaldehyd*
CH₃OH. *Methanol*
cmH₂O. *Zentimeter Wassersäule*
CNC. *computerized numerical control*
CPU. *Central Processing Unit*
CT. *Computertomographie*

D

DICOM. *Digital Imaging and Communication in Medicine*

F

FDM. *fused deposition modeling*

G

GC. *glue control*
GPU. *Graphics Processing Unit*

H

H₂O₂. *Wasserstoffperoxid*
HA. *Hydroxylapatit*
HC. *healthy control*

K

kgKG. *Kilogramm Körpergewicht*
kV. *Kilovolt*

L

LASER. *light amplification by stimulated emission of radiation*

M

mA. *Milliampere*
MB. *Mega Byte*
mmHg. *Millimeter Quecksilbersäule*

N

NaCl. *Natrium Chlorid*
NRRD. *Nearly Raw Raster Data*

P

PBS. *phosphate buffered saline*
PEEK. *Polyetheretherketon*
PMMA. *Polymethylmethacrylat*
Polyaryl. *Polyaryletherketon*
PP. *Polypropylen*
PSI. *patientenspezifisches Implantat*

R

RAM. *Random-Access Memory*

S

SI. *self implant*
SLA. *stereolithography (apparatus)*
SLS. *selective LASER sintering*
STL. *Stereolithography*

T

TR. *Threshold Range*

U

U/min. *Umdrehungen pro Minute*
UV. *Ultraviolett*

V

vgl.. *vergleiche*
VRML. *Virtual Reality Modeling Language*

Hauptteil

1 Einleitung

In einer interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen der Medizinischen Universität Graz, der Montanuniversität Leoben und dem Sondermaschinenhersteller Hage wird ein generatives Verfahren zur Herstellung personalisierter Schädel- und Gesichtsimplantate entwickelt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach der Prozessgestaltung, um den Einsatz von intraoperativ gefertigten, 3D-gedruckten Kunststoffimplantaten zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wird ein optimierter Prozess entwickelt und anhand eines Tiermodells auf dessen Anwendbarkeit überprüft. Auf diese Weise wird der Grundstein gelegt, um zukünftig Wartezeiten und Re-Operationen aufgrund dezentral gefertigter Implantate vermeiden zu können, sowie anfallende Kosten zu reduzieren.

1.1 Hintergrund

Implantate finden in der modernen Medizin einen weitreichenden Einsatz. Die Entwicklung neuer Materialien und Fertigungsmethoden ermöglichen eine zunehmende Wiederherstellung unterschiedlicher Funktionen des Organismus. Dies gewährleistet Patientinnen und Patienten nach Unfall, Krankheit oder altersbedingter Funktionseinschränkung eine höhere Lebensqualität [1–3].

Im Falle der cranio-facialen Chirurgie kommen in erster Linie rekonstruktive Implantate zum Einsatz. Infolge von traumatischen beziehungsweise penetrierenden Kopfverletzungen, Tumor-assoziierten Läsionen sowie Strahlennekrosen, oder therapeutischen Dekompressionsverfahren wird ein Knochenersatz, mit dem Ziel, die anatomische Lagerung des Gehirns wiederherzustellen, eingesetzt [4]. Auf diese Weise werden intracranielle Strukturen geschützt und Folgeschäden (*sinking skin flap syndrom*) vermieden [5,6]. Im weiteren Verlauf wird eine Wiederherstellung der Funktion wie auch ein zufriedenstellender kosmetischer Aspekt angestrebt.

In erster Linie wird der autologe Knochen für die Durchführung einer Kranioplastie herangezogen [3,4,7–14]. Das Eigenimplantat bietet immunologische Unbedenklichkeit, perfekte Passform und geringe anfallende Kosten [12,15]. Im Falle einer Mehrfragmentfraktur, Infektion des Schädelknochens, oder Tumorinfiltration ist eine primäre Reimplantation des patienteneigenen Knochendeckels jedoch nicht möglich. Hierbei erfolgt die Rekonstruktion durch den Einsatz synthetischer, biokompatibler Materialien. Zu diesem Zweck ist eine exakte Anpassung an die individuellen anatomischen Strukturen notwendig.

Die intraoperative Modellierung komplexer dreidimensionaler Formen ist mit einem hohen Zeitaufwand verbunden und liefert häufig unzufriedenstellende kosmetische Ergebnisse [5,11,16]. Die Fertigung patientenspezifischer Implantate erfolgt zumeist durch kommerzielle Anbieter. Hierbei wird der passgenaue Knochenersatz im CAD/CAM-Verfahren anhand (computer-)tomographischer Aufnahmen hergestellt. In der klinischen Anwendung führt die dezentrale Herstellung der Implantate allerdings zu einigen Nachteilen. Durch externe Fertigung besteht eine beträchtliche Latenz zwischen der Kraniotomie und der anschließenden Implantation. Auf diese Weise kann die Rekonstruktion nicht zeitgleich durchgeführt werden – resultierend in der Notwendigkeit einer Zweitoperation und den damit verbundenen körperlichen Belastungen für die Patientinnen und Patienten. Eine weitere Einschränkung stellen potentielle Veränderungen der Knochenläsion innerhalb des interoperativen Intervalls dar. Infolgedessen besteht die Gefahr von Passungenauigkeiten, die im Falle von Titanimplantaten nur schwer korrigiert werden können. Des Weiteren bedeuten die klinikexterne Anfertigung individueller Implantate und die damit verbundene Zweitoperation eine erhebliche finanzielle Belastung für das Gesundheitswesen [3,17].

Durch den Einsatz intraoperativ gefertigter, personalisierter Schädel- und Gesichtsimplantate besteht die Möglichkeit, die Behandlung von Patientinnen und Patienten zu verbessern und gleichzeitig die Therapiekosten für das Gesundheitswesen zu senken. Das Hauptaugenmerk dieses Projekts liegt auf der Prozessgestaltung, um diesen Vorgang mittels dreidimensionalem (3D) Druckverfahren in den klinischen Gebrauch implementieren zu können.

1.2 3D Druck

Rapid-prototyping Systeme finden zunehmend Einsatz im medizinischen Anwendungsbereich [18]. Durch sie besteht die Möglichkeit, kosteneffektiv individuell angepasste Medizinprodukte herzustellen. Der aktuelle wie auch potentielle Einsatz von 3D-Druck in der Medizin umfassen die Herstellung von patientenspezifischen Implantaten [9,19], anatomischen Modellen [20], die Fertigung von Geweben beziehungsweise Organen [21] und die Entwicklung pharmakologischer Modelle [22]. Die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten legen eine revolutionäre Bedeutung für das Gesundheitswesen nahe. Um einen klinischen Routineeinsatz zu ermöglichen sind jedoch weitere wissenschaftliche Untersuchungen sowie regulatorische Maßnahmen notwendig [18,23,24].

Die computergesteuerte Fertigung dreidimensionaler Objekte erfolgt auf unterschiedliche Weise. Im subtraktiven Verfahren werden Gegenstände aus einem Materialblock gefertigt. Mit Hilfe einer computergesteuerten CNC (*computerized numerical control*)-Fräse wird dabei überschüssiger Werkstoff abgetragen. Im Gegensatz dazu steht die Verwendung additiver Herstellungsmethoden (AM – *additive manufacturing*). Hierbei wird der Gegenstand Schicht für Schicht durch Aneinanderreihen zahlreicher Ebenen aufgebaut. Auf diese Weise können komplexe geometrische Formen gestaltet werden [24–26]. Mit Hilfe eines Spezialprogramms wird ein virtuelles Modell in eine Vielzahl an Schnittbildern unterteilt und an das *rapid-prototyping* System gesendet. Der 3D-Drucker erstellt auf Basis dessen jede Ebene in konsekutiver Weise durch selektive Abgabe beziehungsweise Formung des Fabrikationsmaterials.

Es existieren unterschiedliche additive Verfahren, die sich durch die Art, wie sie die einzelnen Schichten erstellen, unterscheiden. Bei der *binder jetting*-Technologie wird ein flüssiges Bindemittel, ähnlich einem konventionellen Tintenstrahldrucker, auf eine Pulverschicht aufgetragen, um dieses auszuhärten. Diese Methode wird auch als *3D-powder printing* bezeichnet.

Der Vorgang des selektiven LASER-Sinterns (SLS) bedient sich eines ähnlichen Ansatzes. Hierbei erfolgt die Solidifikation durch gezieltes Verschmelzen von Kunststoff-, Keramik- oder Metallpulver durch hochenergetische LASER. In der Stereolithographie (SLA) werden hingegen photoaktive Kunstharze mittels UV-LASER zur Polymerisation angeregt.

Ein weiteres Verfahren stellt das *fused deposition modeling* (FDM) dar. Bei dieser Fertigungsmethode werden schmelzfähige Kunststoffe durch eine aufgeheizte Düse verflüssigt und anschließend an der gewünschten Stelle deponiert. Nach Abkühlen und Aushärten der jeweiligen Ebene wird dieser Vorgang Schicht für Schicht wiederholt und somit der Gegenstand aufgebaut. Diese Methode ermöglicht die Verwendung diverser Kunststoffe. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung des genannten Verfahrens.

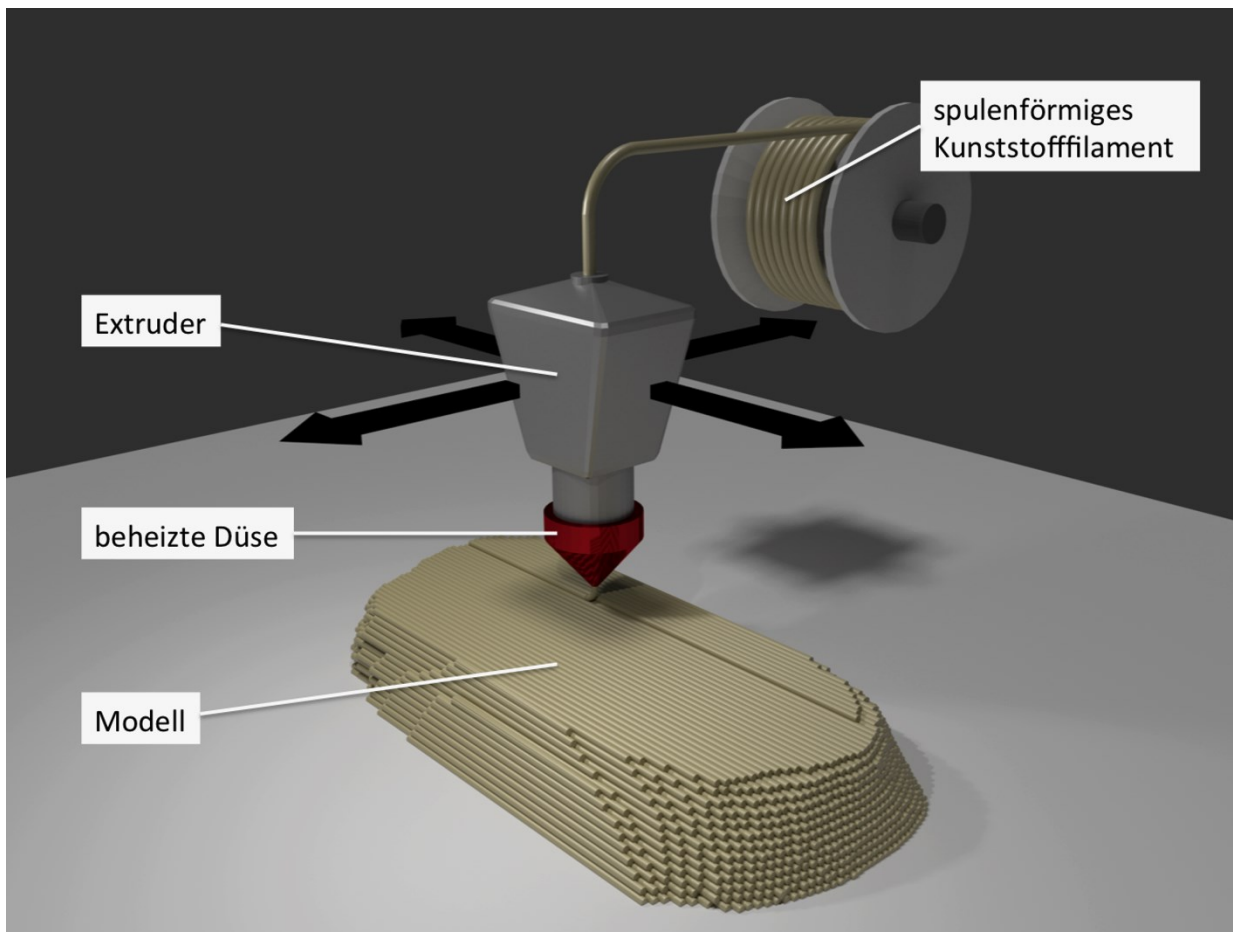


Abbildung 1.1 - Fused deposition Modeling: Schematische Darstellung der Implantatfertigung; Rendering aus Blender v2.75a; Q.: eigene Darstellung nach [27]

1.3 Kunststoffe

Durch Innovationen auf dem Gebiet der Kunststofftechnik sowie fortwährende Weiterentwicklungen generativer Apparate steht eine steigende Anzahl an druckbaren Materialien zur Verfügung. Die Charakteristika der verwendeten Baustoffe wie auch die Verarbeitungsparameter beeinflussen hierbei die finalen Eigenschaften des FDM-gedruckten Gegenstandes [28].

Der Einsatz von Kunststoffen im medizinischen Bereich erfordert ein aufwändiges Prüfverfahren. In Abhängigkeit vom Einsatzgebiet werden unterschiedliche Anforderungen an die jeweiligen Materialien gestellt. Polymere in medizinischen Apparaten und Materialien, die außerhalb des Körpers angewendet werden, dürfen keine schädlichen Inhaltsstoffe an Flüssigkeiten oder andere Substanzen, die dem Körper zugeführt werden, abgeben. Kunststoffe für den intracorporalen Einsatz müssen weitaus strengere Kriterien erfüllen. Sämtliche Materialien sowie potentielle Abbauprodukte müssen über eine (Bio-)Kompatibilität mit den körpereigenen Zellen und Geweben verfügen und dürfen keine Substanzen in toxischen Konzentrationen freisetzen. [29] Die Verwendung als Knochenersatz erfordert zudem anhaltend hohe mechanische Ansprüche an den Kunststoff. Die nachteiligen Eigenschaften konventioneller Implantatmaterialien aus Titan und Cobalt-Chrom-Legierungen trieben die Suche nach synthetischen Alternativen voran[30].

Seit rund zwei Jahrzehnten finden Polyaryletherketone (PAEK) zunehmend Einsatz als Biomaterial für orthopädische und traumatologische Implantate. Die chemische Struktur polyaromatischer Ketone ermöglicht ausgezeichnete mechanische Eigenschaften, eine hohe Temperaturresistenz (>300°C) und Widerstandsfähigkeit gegen chemische und ionisierende Einflüsse. Der Kunststoff besitzt zudem eine vielseitige Kompatibilität mit strukturstärkenden Mitteln, wodurch das Elastizitätsmodul dem Wert des humanen Knochens angepasst werden kann. [31]

Polyetheretherketon (PEEK) ist das am häufigsten verwendete Derivat aus der PAEK-Gruppe. Das Polymer ist chemisch inert und mit Ausnahme von 98%-Schwefelsäure unlösbar. Bei Körpertemperatur liegt PEEK im glasförmigen Zustand vor. Der Kristallitschmelzpunkt beträgt 343°C, wodurch in der Verarbeitung durch Spritzguss, Extrusions- und Kompressionsverfahren Temperaturen zwischen 390°C und 420° notwendig sind. [31] Die hohen Temperaturen stellen eine besondere Herausforderung an die verarbeitenden Maschinen dar, die durch Standard-Drucksysteme nicht bewältigt werden können.

1.4 Problemstellung

Im Zuge des Forschungsprojekts muss durch den Projektpartner Hage GmbH ein Spezialdrucker angepasst werden, um die Anwendung medizinischer Hochleistungspolymere für die Implantaterstellung zu ermöglichen. Des Weiteren wird eine Schnittstelle zwischen dem bildgebenden Verfahren und dem Drucksystem benötigt. Zurzeit besteht keine kommerziell verfügbare Softwarelösung um mittels Computertomographie (CT) akquirierte DICOM(*Digital Imaging and Communication in Medicine*)-Daten zu analysieren und nahtlos einem *rapid-prototyping* System zuzuführen [27]. Die vorliegende Arbeit widmet sich hierbei in erster Linie dem Gestaltungsprozess der virtuellen Implantatmodelle sowie der Durchführung des Tierversuchs zur Überprüfung der Prozesskette.

Durch die CT-Bildgebung werden die jeweiligen Röntgen-Absorptionswerte des untersuchten Gewebes computerunterstützt rekonstruiert und als zweidimensionales Schnittbild wiedergegeben [32,33]. Eine Vielzahl hintereinanderfolgender Ebenen ermöglicht eine dreidimensionale Orientierung. DICOM-Dateien können allerdings nicht von 3D-Druckern interpretiert werden, da hierdurch keine zusammenhängende Oberfläche, sondern jeweilige Einzelpunkte beschrieben werden. Es existieren Software-Produkte, um eine Transkription der DICOM-Daten in ein verarbeitbares STL-, oder VRML-Format manuell oder semiautomatisch durchzuführen [9,34]. Die Umwandlung erfolgt meist durch Segmentierung und anschließende Oberflächendarstellung mittels Kontur-Extraktions-Algorithmus (*marching cube*) [27].

Die Herausforderung besteht jedoch darin, anhand des vorhandenen Knochenmodells auf das entfernte Knochenstück und somit die Form des Implantats rückzuschließen. Die notwendigen Detektionsmechanismen und Algorithmen müssen schließlich entwickelt werden. Die Anforderungen an dieses Vorgehen umfassen eine möglichst schnelle Umsetzung der Daten sowie ein hohes Maß an Passgenauigkeit, um ein einzeitiges Vorgehen ohne zusätzliche Modifikationen zu ermöglichen. Für das vorliegende Projekt wurde dieser Schritt manuell durchgeführt.

Die Überprüfung der Passgenauigkeit sowie der Anwendbarkeit der Prozesskette erfolgt schließlich durch die Entwicklung und Umsetzung eines Tiermodells. Ein weiteres Augenmerk liegt auf der Analyse möglicher klinischer Effekte infolge der Interventionen.

Das gesamte Projekt widmet sich zudem der Frage nach potentiellen Materialalterationen im Zuge des Herstellungsprozesses. Zu diesem Zweck werden die mechanischen und physikalischen Eigenschaften der FDM-Implantate untersucht. Des Weiteren erfolgt eine immunhistochemische Analyse der Meningen und des Cortex auf potentielle inflammatorische Reaktionen. Die Analyse und Beschreibung dessen ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die Untersuchung und Prozessentwicklung erfolgten im Sinne einer prospektiven Interventionsstudie.

Im Rahmen eines experimentellen Tierversuchs wurde eine In-vivo-Analyse durchgeführt. Die Anwendung und mögliche Auswirkungen FDM-gedruckter Implantate wurden in Parallelgruppen geprüft. Als Vergleichsgegenstand dienten gesunde Tiere ohne jegliche Intervention (HC), eine Gruppe, die nur der Narkose und dem Hautschnitt unterzogen wurde (AC), und eine Fraktion, die mit dem zur Implantatfixierung verwendeten Kleber behandelt wurde (GC). In den weiteren Gruppen wurden kraniotomierte Tiere mit autologer Reimplantation, PEEK-Implantaten (*batch I und II*) und PP-Implantaten untersucht.

Den oben angeführten Gruppen wurden jeweils fünf Tiere zugeordnet. Männliches Geschlecht, Wildtyp und ein Mindestalter von zehn Wochen wurden als Inklusionskriterien festgelegt. Die Einschränkung auf dieses Geschlecht erfolgte aufgrund der zu erwartenden größeren Schädelverhältnisse [35] und der resultierenden Möglichkeit zu größeren Kraniotomien. Es wurde kein gesondertes Randomisierungsverfahren angewandt. Eine sichtbare Penetration der Dura Mater im Zuge des Operationsvorgangs führte zu einem strikten Ausschluss der verletzten Versuchstiere. Potentiell schädigende Effekte wurden an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Als Endpunkt der Untersuchung wurden hierbei der fünfte sowie der 14. postinterventionelle Tag festgelegt. Nach Abschluss des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere der jeweiligen Versuchsgruppen zur Organentnahme und weiteren Analyse euthanasiert.

Der vorliegende Versuch ist gemäß §26, Absatz 1 des Österreichischen Bundesgesetz über Versuche an lebenden Tieren (Tierversuchsgesetz 2012 – TVG 2012) genehmigungspflichtig. Die Zustimmung des Österreichischen Bundesministeriums für Wissenschaft und Forschung erfolgte unter dem Aktenzeichen BMWFV-66.010/0041-WF/V/3b/2015.

2.2 Prozessentwicklung

Die Entwicklung und Erprobung des Modell-Herstellungsvorganges wurde im Vorfeld durchgeführt.

Insgesamt wurden rund 32,5 Stunden einführende wie auch spezialisierte Anleitungen [38–42] zur Anwendung von Blender v2.75a absolviert. Auf diese Weise konnten eine Orientierung an der Programmoberfläche, die Navigation im dreidimensionalen Raum, bedeutende Tastenkombinationen und Kompetenzen zur Fehlerbehebung erarbeitet werden, wodurch eine selbständige Beschäftigung mit dem Programm ermöglicht wurde. Im Ausmaß von 76,75 Stunden erfolgten eine selbständige, aufgabengerichtete Spezifizierung und das problemorientierte Erlernen des Programms. Die zweckgerichtete Verwendung von 3D-Slicer wurde nach einem einführenden Gespräch mit einer anwendungsvertrauten Person in insgesamt 18,75 Stunden mit Hilfe des 3D Slicer Online-Wikis [43] erlernt.

Die Erprobung und Optimierung des Translationsvorganges erfolgte anhand der CT-Daten (siehe 2.5.4) von drei euthanasierten Ratten. Die Schädel wurden sämtlicher Weichteile entledigt und einer Kraniotomie unterzogen (siehe 2.5.1.1). Während der Prozessgestaltung wurden die einzelnen Schritte dokumentiert und mit den jeweiligen Zeiten versehen. Dies geschah im Einzelversuch. Vor der Durchführung des Tierversuchs wurden Probeimplantate gedruckt und auf deren Anwendbarkeit untersucht (siehe 2.2.1).

2.2.1 Implantatevaluierung

Die Beurteilung der Implantat-Prototypen wurde anhand deren Passgenauigkeit wie auch der Unterflächenbeschaffenheit vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Eigenschaften anhand einer zehnstufigen Skala klassifiziert.

Ein Wert von zehn stellte hierbei das Optimum dar, wohingegen fünf eine geradewegs tolerable Abweichung bedeutete. Um als anwendbar zu gelten mussten beide Parameter einen Mindestwert von fünf aufweisen.

Die Anforderungen an ein optimales Implantat umfassen die Möglichkeit des Einsetzens ohne Druck unter Beibehaltung der Schädelkontur, ohne makroskopischen Bewegungsfreiraum. Zur Beurteilung der Unterseite des Implantats wurde die Beschaffenheit wie auch die Anpassung an die innere Krümmung inspiziert. Eine glatte Unterfläche und die Fortsetzung der natürlichen Krümmung, ohne das Auftreten einer Stufen- oder Spaltbildung, wurden hierbei als Optimum angenommen. Die Klassifizierung erfolgte stets durch dieselbe Person.

Für die Implantatüberprüfung wurden die Schädel zweier zuvor euthanasierter Ratten herangezogen. Die Eröffnung des Cranium erfolgte auf dieselbe Weise, wie sie später bei den Tierversuchen angewandt wurde (siehe 2.5.1.1). Die Bildgebung erfolgte sowohl prä- als auch postoperativ. Anschließend wurden die Schädelknochen von sämtlichen Weichteilen befreit und die Passgenauigkeit der Implantate überprüft. Vier unterschiedliche Verfahren zur Implantatgestaltung (Methode 1-3, *Subtraction only*) und vier unterschiedliche Materialien beziehungsweise Materialkombinationen wurden der Prüfung unterzogen (PEEK, PP, PP auf PP, PPSU). Insgesamt wurden 30 FDM-gedruckte Implantate evaluiert.

Auf Basis der Beobachtungen während des Modellierungsvorganges und der Implantatevaluierung erfolgten die Formulierung des schlussendlichen Translationsprozesses und die Anwendung dessen im Tierversuch.

2.3 Versuchstiere

Der Versuch wurde an männlichen Sprague Dawley® Ratten (Charles River, Bois des Oncins) im Alter zwischen zehn und 49 Wochen durchgeführt. Zu Beginn der Untersuchungen betrug die mittlere Körpermasse 510 (SD: ±43) g. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte durch eine codierte Stanzung der Ohren, sowie durch fortlaufende Bezifferung durch einen Permanentmarker am Stamm-Schwanz-Übergang.

Die Ratten wurden im Kleintierstall des Bereichs biomedizinische Forschung ohne gesonderte Quarantänemaßnahmen unter keimarmen Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug $20\pm 4^{\circ}$ Celsius bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30-70%. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch künstliche Beleuchtung mit einer automatischen Zeitschaltuhr im 12-Studentakt geregelt. Wasser und pelletiertes Standardfutter wurde ad libitum verabreicht. Die Tiere wurden in Verbänden zu maximal drei Tieren in Eurostandard Typ IV-Käfigen (1354G, Tecniplast, Buguggiate) auf einer Bettungsschicht aus staubreduzierten Sägespänen und Holzwolle gehalten. Bei Bedarf erfolgte ein Umsetzen der Ratten im Abstand zwischen zwei und drei Wochen. Eine Kontrolle durch Tierpflegepersonal erfolgte mehrmals täglich.

2.4 Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien und Medikamente, welche im Rahmen der Tierversuche zum Einsatz kamen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1 – Auflistung der Operationsmaterialien: Produktbezeichnung, Wirkstoff, Einsatz und Hersteller;

Produkt	Wirkstoff	Einsatz	Hersteller, Firmensitz
Alcohol Prep Pads	Isopropanol- Alkohol	Hautdesinfektion	Henry Schein, Gillingham
Anexate	Flumazenil, 0,1mg/ml	Benzodiazepin - Antidot	Roche Austria, Wien
Antisedan	Atipamezoli hydrochloridum, 5mg/ml	Medetomidine - Antidot	Bayer Austria, Wien
Baytril	Enrofloxazin, 25mg/ml	antibiotische Prophylaxe	Bayer Austria, Wien
Bepanthen- Augensalbe	Dexapanthenol 5%	Hydratation der Conreae	Bayer vital GmbH, Leverkusen
Betaisodona Lösung standardisiert	Povidon-Iod Komplex, 100mg/ml	Hautdesinfektion	Mundipharma, Wien
Domitor	Medetomidine, 1mg/ml	Narkose	Orion Corporation, Espoo
Fentanyl-hameln	Fentanyl, 50µg/ml	Opiat, Analgesie, Narkose	Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln
Folio drape		Op-Abdeckung	Hartmann Group, Heidenheim
Forane - Inhalationsnarkotikum	Isofluran	volatiles Anästhetikum	AbbVie GmbH, Wien
Formaldehydlösung,	CH ₂ O, 37%; CH ₃ OH, 10%	1:10 in PBS, Fixationslösung	Merck, Darmstadt
Gazin		Tupfer aus Verbandmull	Lohmann & Rauscher, Wien
iCEM Self Adhesive		Implantatfixation	Heraeus Kulzer, Hanau
Midazolam ERWO	Midazolam, 5mg/ml	Benzodiazepin, Hypnotikum, Narkose	Erwo Pharma, Brunn am Gebirge
Neolus 26 G x 23		Injektionsnadeln	Terumo, Tokio
Physiologische Kochsalzlösung	NaCl 0,9%	Spülung, Volumen für Injektionszwecke	Frensius, Graz
Rimadyl	Carprofen, 50mg/ml	postoperative Schmerzmedikation	Zoetis Schweiz GmbH, Zürich
Sekusept PLUS		Instrumentendesinfektion	Ecolab, Düsseldorf
Sterillium classic pure	Propan-2-ol, Propan-1-ol, Mecetroniumetilsulfat	Händedesinfektion	Hartmann Group, Heidenheim
Thiopental	50 mg/ml	Barbiturat, Narkose (final)	Sandoz, Kundl
Vicryl 4-0		resorbierbares Nahtmaterial	Ethicon, Sommerville
Virkon S		viruzides tiermedizinisches Breitband- Desinfektionsmittel	Du Pont, Wilmington
Wasserstoffperoxid - lösung	H ₂ O ₂ , 30%	1:10 in PBS, Blutstillung	Sigma Aldrich, Steinheim

2.5 Versuchsaufbau

Die Versuchstiere wurden in neun Gruppen á fünf Ratten aufgeteilt. Die Kontrollgruppen umfassten *Healthy Control* (n=5), *Anaesthesia Control 5 days* (n=5), *Glue Control 5 days* (n=5) und *Glue Control 2 weeks* (n=5). Die Implantatmaterialien wurden in fünf Gruppen analysiert. *PEEK batch I 5 days* (n=5), *PEEK batch II 5 days* (n=5), *PEEK batch II 2 weeks* (n=5), sowie *PP 5 days* (n=5) und *self-implant 5days* (n=5).

Die Versuche der unterschiedlichen Gruppen fanden in konsekutiver Weise statt. Für die Implantation der 3D gedruckten Implantate wurden die Tiere zweimal operiert. Zunächst wurden die Tiere kraniektomiert und die Läsionen computer-tomographisch erfasst. Im Anschluss wurden die Modelle für das Druckverfahren generiert und extern bei HAGE Sondermaschinenbau im additiven Verfahren hergestellt. Am zweiten postoperativen Tag wurden die Implantate dampfsterilisiert (siehe 2.7.2) und schließlich implantiert. Die Intervention der Kontrollgruppen konnte jeweils an einem Tag abgeschlossen werden. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes wurden die Tiere zur Organentnahme euthanasiert.

2.5.1 Operationsmethoden

Die Operationen wurden in einem Laboratorium in den Räumlichkeiten des Bereichs Biomedizinische Forschung durchgeführt. Sämtliche Eingriffe erfolgten tagsüber und durch dasselbe Team, bestehend aus einem Operateur und einem Assistenten. Bei der Durchführung der Operationen wurde auf die Einhaltung bestmöglicher Sterilität geachtet. Die Oberflächendesinfektion des stereotaktischen Rahmens (Neurostar GmbH, Tübingen), sowie des Operationsbereichs wurde mittels Wischdesinfektion, bestehend aus 1%-Virkon S® (Du Pont, Wilmington), durchgeführt. Schließlich erfolgte eine weitgehende Abdeckung des Operationsbereichs mit sterilen Tüchern (Folio drape, Hartmann Group, Heidenheim). Die Instrumente wurden in einem Desinfektionsbad (Sekusept PLUS, Ecolab, Düsseldorf) dem Produktdatenblatt entsprechend behandelt.

Von Seiten des Operationsteams wurde auf eine strenge Händehygiene, ständiges Wechseln und Desinfektion (Sterillium classic pure, Hartmann Group, Heidenheim) der Schutzhandschuhe, sowie angemessene Bereichskleidung geachtet. Zur Ausleuchtung des Operationsgebietes wurde eine Kaltlichtlampe (KL 1500 LCD, Schott AG, Mainz) verwendet.

Die Versuchstiere wurden rund 20 Minuten vor dem Beginn des Eingriffs aus dem Kleintierstall in einen beleuchteten, wohltemperierten Raum gebracht. Nach dem Eintreten der Beruhigung wurden die Ratten einzeln einer Gasnarkose unterzogen. Das O₂:Isofluran-Flussverhältnis wurde mit 2,5:5 l/min festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Körpergewicht der Versuchstiere ermittelt. Im Anschluss an das Erlöschen des Aufricht-Reflexes erfolgte die körpermassenadaptierte, intraperitoneale Injektion eines vorab angefertigten Narkosegemisches. Die Administration der Initialdosis von 1ml/kgKG (0,02 mg/kgKG Fentanyl, 0,4 mg/kgKG Midazolam, 0,4 mg/kgKG Medetomidine) erfolgte nach Desinfektion der Einstichstelle und unter Schonung der abdominalen Organe.

Durch die Verwendung einer homeothermen Wärmematte wurde die anal gemessene Körpertemperatur während der Anästhesie konstant auf $36,5 \pm 1^\circ$ Celsius gehalten. Zur Protektion der Augen wurde eine Augensalbe auf die Corneae aufgetragen (Bepanthen-Augensalbe, Bayer vital, Leverkusen) und ein Blendschutz angebracht. Nach rund zehn Minuten wurde die Wirksamkeit der Narkose mittels palpatorischer Herzfrequenzeinschätzung und Durchführung eines Schmerzreizes untersucht. Bei unzureichender Analgesie oder Wiederkehren des Aufricht-Reflexes wurde die Betäubung mit einem subcutan applizierten Bolus von 0,2 ml bis zu einer Maximaldosis von 2 ml/kgKG ergänzt.

Zur prophylaktischen bakteriellen Abdeckung wurden 0,3 ml/kgKG Enrofloxazin- Lösung (Baytril® 2,5%, Provet AG, Lyssach b. Burgdorf) in das Unterhautfettgewebe im Bereich des Nackens injiziert (7,5 mg/kgKG).

2.5.1.1 Kraniotomie

Das Operationsgebiet wurde mit einem elektrischen Rasierer unter Schonung der Vibrissen vom Fell befreit und anschließend mittels Isopropanol-Tupfer desinfiziert. In weiterer Folge wurde der Schädel im stereotaktischen Rahmen ausgerichtet und fixiert.

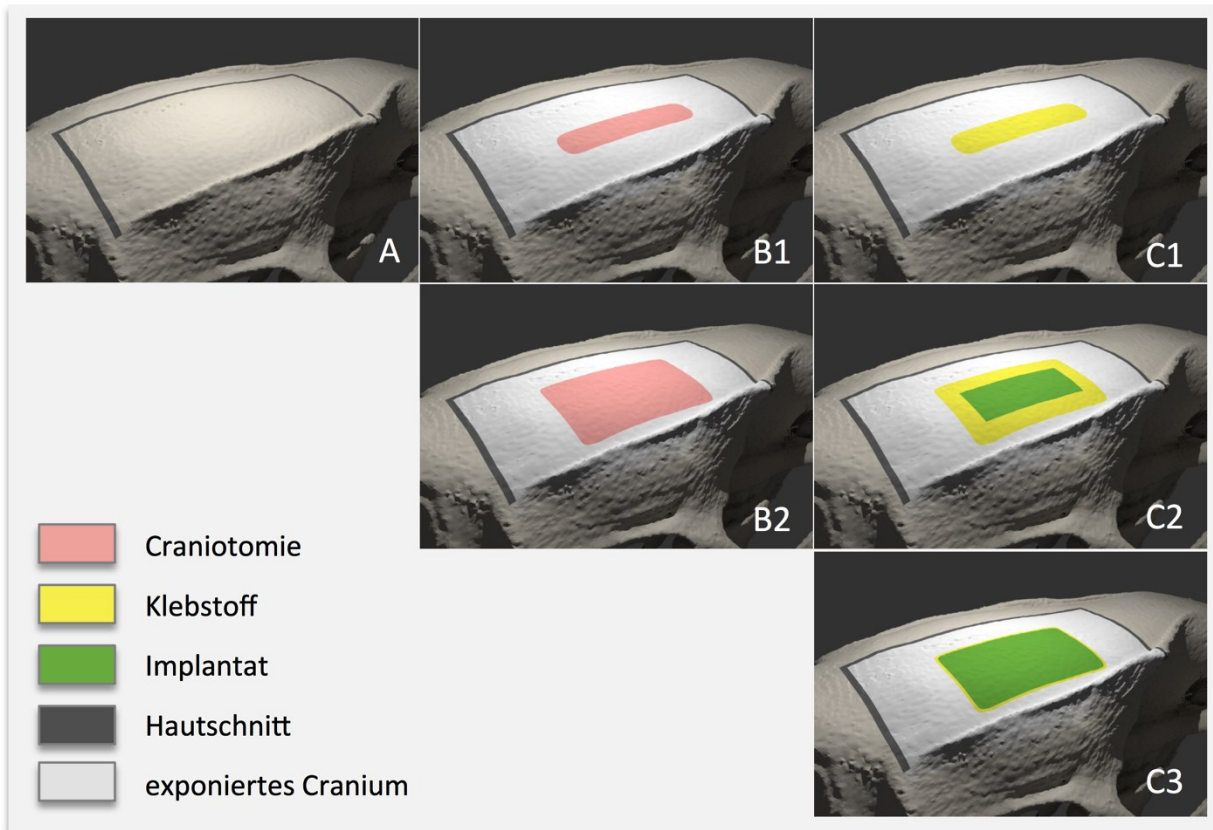


Abbildung 2.1 - operative Interventionen: Renderings aus Blender v2.75a, Ansicht von lateral-posterior nach anterior; A) schematische Projektion des Hautschnittes B1) schlitzförmige Kraniotomie B2) Knochendeckelentfernung C1) Glue Control C2) Self Implant C3) FDM-gedruckte Implantate; Q.: eigene Darstellung

Es erfolgte ein etwa 15 mm langer, die Mittellinie überschreitender, U-förmiger Hautschnitt, ohne die Faszie des *Musculus temporalis* zu verletzen (siehe Abbildung 2.1 – A). Das Periost wurde weitgehend retrahiert und das darunterliegende Cranium dargestellt.

Das Eröffnen des Schädels wurde semi-automatisch mit Hilfe eines Bohr-Roboters (Robot Stereotaxic, Neurostar GmbH, Tübingen) durchgeführt. In einem ersten Schritt erfolgte die Bestimmung eines Bezugspunkts an der Schädeloberfläche. Zu diesem Zweck wurde der Bohrkopf durch computergestützte Steuerung mit Bregma übereingebracht [36]. Die Position des *Skull Starting Point* wurde 1 mm posterior und 1 mm lateral des Bezugspunkts, im Bereich der rechten Hemisphäre festgelegt. Die Exkursion in sagittaler Richtung betrug $6 \pm 0,5$ mm. Die horizontale Ausdehnung der Läsion wurde mit 4 bis 4,5 mm bemessen. Der Wert der dorso-ventralen Progression des 0,5 mm breiten Bohrers betrug 50 μ m. Die Gesamttiefe wurde anfangs auf 250 μ m eingestellt und schrittweise um 100 μ m angehoben. Die Bohrkopfgeschwindigkeit betrug 6000 U/min. Abbildung 2.1 – B2 zeigt eine schematische Darstellung der Lokalisation sowie des Ausmaßes der Kraniotomie.

Der Bohrvorgang wurde unter wiederholtem Spülen mit steriler NaCl-Lösung durchgeführt, um Hitzeschäden zu vermeiden. Zur Blutstillung wurde gegebenenfalls 3% H₂O₂-Lösung angewandt. Ab dem Zeitpunkt der Transluzenz duraler Gefäße wurde der Bohrer angehalten und ein Hebeversuch des Knochendeckels durchgeführt. Bei bestehender Adhäsion wurde das Vorgehen manuell fortgesetzt bis eine Entfernung möglich war. Ein besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, die Dura mater nicht zu verletzen. Nach erfolgreicher Kraniotomie wurde die entstandene Läsion ausgiebig mit steriler 0,9 % Kochsalz-Lösung gereinigt und von Knochenmehl befreit. Der Wundverschluss wurde mit Einzelknopfnähten (Vicryl 4-0, Ethicon, Sommerville) im Abstand von rund 2 mm erzielt. Nach erfolgter Adaptation der Wundränder wurde das Operationsgebiet mit antiseptischer Lösung (Betadine® standardisiert 11mg/ml, Mundipharma, Wien) behandelt. Von einer zusätzlichen Wundaufgabe wurde Abstand genommen.

2.5.1.2 Reimplantation

Die Zweitoperation erfolgte zwei Tage nach der Kraniotomie. Hierbei wurde die Operationsvorbereitung in ebengenannter Weise durchgeführt. Nach Desinfektion des Wundgebietes mit einer Povidon-Iod-Lösung wurden die Nähte wie auch allfälliger

Wundschorf zur Gänze entfernt. Es folgte eine ausgiebige Spülung und Reinigung des Schädeldefekts mit steriler 0,9% NaCl-Lösung. Anschließend wurde ein autoklaviertes Implantat (siehe Punkt 2.7.2) zur Überprüfung der Passgenauigkeit in die Läsion eingesetzt. Bei positiver Kompatibilität wurde dasselbe Implantat an den Rändern mit einem Spezialkleber (iCEM, Heraeus Kulzer, Hanau) versehen und unter dem Gewicht eines zahnärztlichen Raspatoriums in den Defekt eingebettet. Zur Aushärtung des Klebers wurde zwei Mal 15 Sekunden UV-Licht appliziert. Nach erfolgter Kranioplastie wurde mit Kochsalzlösung gespült. Der Wundverschluss erfolgte mit Einzelknopfnähten (Vicryl 4-0, Ethicon). Abschließend wurde Povidon-Iod zur Oberflächendesinfektion angewandt. Auf eine zusätzliche Wundabdeckung wurde verzichtet. Eine schematische Darstellung der finalen Situation ist in Abbildung 2.1 – C3 dargestellt.

2.5.1.3 Self-Implant

Die Tiere dieser Versuchsgruppe (SI5d) erfuhren dieselben Vorbereitungsmaßnahmen wie zuvor angeführt. Das Vorgehen der Kraniotomie fand in identer Weise statt, wie in Punkt 2.5.1.1 beschrieben. Nach erfolgter Öffnung des Schädels wurde das entnommene Knochenstück in einem sterilen Eppendorf®-Röhrchen bei -20° Celsius gelagert. Der Defekt wurde ausgiebig mit steriler 0,9% NaCl-Lösung gespült und von Knochenmehl befreit. Überschüssige Flüssigkeitsansammlungen wurden mit Kugeltupfern (Gazin, Lohmann & Rauscher, Wien) entfernt.

Die Re-Implantation des autologen Knochenstücks erfolgte zwei Tage nach der Kraniotomie. Vor dem Einsetzen wurde der Span auf Raumtemperatur aufgewärmt und in Povidon-Iod-Lösung getaucht. Die Reinigung desselben erfolgte mit steriler Kochsalzlösung. Eine Schicht des Spezialklebers wurde auf den Rand des Knochenstücks aufgetragen und mit UV-Licht zur Aushärtung gebracht, um den Umfang zu steigern (siehe Abbildung 2.1 – C2). Anschließend wurde der Rand des Knochendefekts mit dem Kleber bestrichen und das Eigenimplantat eingesetzt. Danach erfolgte die Aushärtung mit zwei Mal 15 Sekunden UV-Licht. Im Anschluss wurden die Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung und der Wundverschluss mit Einzelknopfnähten durchgeführt.

2.5.2 Kontrollgruppen

2.5.2.1 Healthy Control

An den Tieren dieser Gruppe wurde keine Intervention vorgenommen. Die Körpermasse wurde vor der Euthanasie erhoben.

2.5.2.2 Glue-Control

Die Operationsvorbereitung wurde wie vorhin beschrieben durchgeführt. Die Kraniotomie erfolgte in ähnlicher Weise wie zuvor in Punkt 2.5.1.1 dargestellt. Eine Abweichung ist durch die Form und Position der Schädelöffnung gegeben (siehe Abbildung 2.1 – B1). Der *Skull-Starting Point* wurde 1 mm posterior und 2,5 mm lateral von Bregma, im Bereich der rechten Hemisphäre gewählt. Die Länge der Kraniotomie wurde mit 6,5 mm bemessen. Die laterale Auslenkung des Bohrkopfes betrug Null – respektive wurde eine dem Dremelbohrerdurchmesser entsprechende seitliche Ausdehnung von 0,5 mm erzielt. Der Bohrvorgang wurde unter wiederholtem Spülen mit physiologischer Kochsalz-Lösung bis zum Erreichen der Dura Mater, unter Schonung derselben, durchgeführt. Es folgte das Trockentupfen der entstandenen Läsion mittels Kugeltupfern. Der Defekt wurde mit dem zur Implantatfixierung verwendeten Spezialkleber, wie in Abbildung 2.1 – C1 dargestellt, bis zum Oberrand aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit zwei mal 15 Sekunden UV-Licht. Es folgte die Wundversorgung durch Einzelknopfnähte, sowie die anschließende Oberflächendesinfektion mit Povidon-Iod.

2.5.2.3 Anaesthesie-Kontrolle

Die Tiere, welche der Anästhesie-Kontrollgruppe zugeteilt wurden, erfuhren dieselben Vorbereitungsmaßnahmen, wie vorhin beschrieben. Nach Sicherstellen der Wirksamkeit der Narkose durch palpatorische Einschätzung der Herzfrequenz und Setzen eines Schmerzreizes, wurde analog zum Vorgehen bei der Kraniotomie ein Hautschnitt gesetzt. Die Galea wurde retrahiert und das Cranium dargestellt. Im Anschluss erfolgte der Wundverschluss mit Einzelknopfnähten.

Die Körpertemperatur wurde während des Vorgangs konstant auf 36,5° Celsius gehalten. Nach Ablauf der Zeit wurde das Narkose-Gegenmittel, wie in Punkt 2.5.2.3 beschrieben, verabreicht. Das Vorgehen erfolgte für jeweils 5 Tiere annähernd zeitgleich.

2.5.3 Postinterventionelle Versorgung

Nach Durchführung des geplanten Eingriffs und etwaiger bildgebender Verfahren (siehe Punkt 2.5.4) wurde die Wirkung der Narkose durch die Injektion der jeweiligen Antagonisten aufgehoben. Eine Kombination aus 20 mg/2ml Flumazenil (Anexate®, Roche, Wien), 1,25 mg/0,25ml Atipamezoli hydrochloridum (Antisedan®, Orion Corporation, Espoo) und 0,75 ml physiologische Kochsalzlösung wurde zuvor in einer Spritze zubereitet. Eine Standarddosis von 0,1 ml/kgKG des Antidot-Gemischs wurde nach Desinfektion der Einstichstelle in das subcutane Fettgewebe injiziert (0,07 mg/kgKG Flumazenil, 0,4 mg/kgKG Atipamezoli hydrochloridum). Anschließend wurden die Tiere in den Käfig, dem sie anfangs entnommen wurden, übersetzt und in Holzwolle gebettet. Nach rund drei Minuten wurden die Tiere auf das Wiederkehren des Aufrichtreflexes und das Auftreten allfälliger Bewegungen untersucht.

Die postoperative Schmerzmedikation bestand in der Fortführung der Opiat-Analgesie. 24 Stunden nach der Operation erhielten die Tiere einen subcutan injizierten Bolus von 10 mg/kgKG Carprofen (Rimadyl®, Zoetis Schweiz GmbH, Zürich) und eine weitere Dosis Baytril (7,5 mg/kgKG).

Die Tiere wurden einer täglichen Kontrolle unter Berücksichtigung allfälliger neurologischer Besonderheiten (Epilepsie, Paralyse), sowie Zeichen der Lahmheit unterzogen. Zu diesem Zweck wurden keine spezifischen Testungen durchgeführt. Mögliche Wunddehiszenzen wurden im Laufe des Beobachtungszeitraumes wiederholt kontrolliert und gegebenenfalls durch Einzelknopfnähte korrigiert.

2.5.4 Bildgebung

Nach erfolgter Kraniotomie wurden die operierten Versuchstiere unter Fortsetzung der Narkose jeweils einer Micro-Spiral CT (Inveon Micro CT, Siemens, Erlangen) in den Räumlichkeiten des Bereichs biomedizinische Forschung unterzogen. Die Scanning-Parameter wurden folgendermaßen festgelegt: 70 kV, 500 μ A, 0,035 mm *slice-thickness*. Nach anschließender Rekonstruktion der Rohdaten mittels Computersoftware, (Inveon CT Recon Software v2.04, Siemens, Erlangen) wurden diese schließlich im DICOM-Format gespeichert.

Auf diese Weise wurde ein Zielvolumen mit einer Abmessung von 51,8 x 51,8 x 36,0 mm in 1472 Schnittbilder mit sagittaler, beziehungsweise horizontaler Ausrichtung abgebildet. In der Frontalebene wurden respektive 1024 Schichten aufgezeichnet – resultierend in einer Voxel-Size von 0,035 mm ($\approx 4,36 \times 10^{-5}$ mm³). Dieser Vorgang wurde unter Verwendung eines Desktop Computers (Fujitsu Celsius M470-2, CPU W3520@2,6 GHz, RAM 18GB, Betriebssystem: Microsoft Windows 10 Pro) durchgeführt.

2.6 Digitalisierung und Modellerstellung

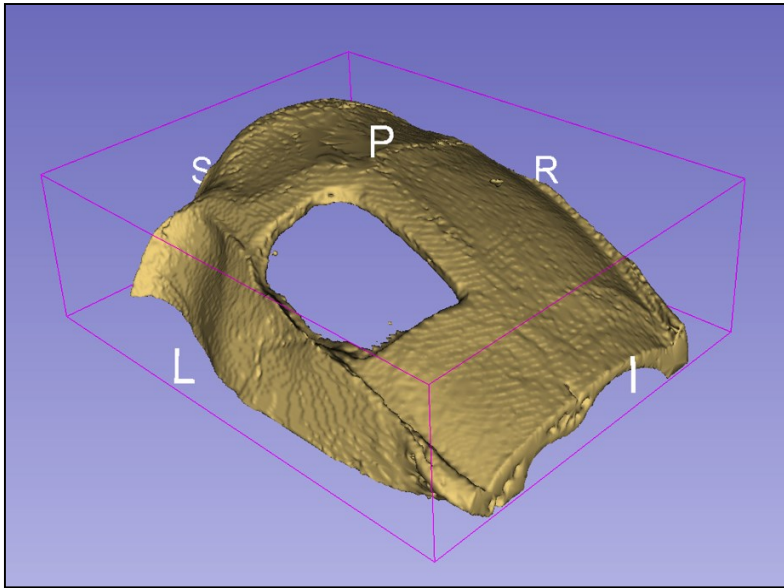
Der Translationsprozess zwischen Bildgebung und Implantatfertigung wurde stets von derselben Person auf einem Notebook durchgeführt (Apple MacBookPro, CPU Core i5@2,6 GHz, RAM 16 GB, GPU Intel Iris 1536 MB, Betriebssystem: OSX Yosemite).

2.6.1 3D Knochenmodell

Das Datenkonvolut aus der CT-Bildgebung wurde zur weiteren Bearbeitung in eine *open-source* Visualierungs- und Analysesoftware (3D Slicer v4.4.0) importiert [37]. In Anbetracht des hohen Rechenaufwandes wurde eine Reduktion des Datensatzes angestrebt, um den Prozess auf dem genannten Gerät durchführen zu können.

Mittels *Volumes-Module* wurden in einem ersten Schritt die Parameter: *Image-Spacing*, *-Dimensions* und *-Origin* ausgelesen und in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel for Mac 2011 v14.5.2, Microsoft, Redmond) übertragen. Anschließend wurde das Modul *Resample Scalar Volume* geladen und der Parameter *Spacing* auf den doppelten

Ausgangswert angehoben. Als *Sampling*-Algorithmus diente die Interpolationsmethode *Linear* [38]. Die resultierenden NRRD- Files wurden für die weitere Bearbeitung zwischengespeichert.



Unter Verwendung der *Crop Volume*- Funktion wurde das Zielvolumen auf den Bereich zwischen den jeweils am weitesten lateral gelegenen Ausläufern der Lambdanaht und der Sutura coronalis – nach occipital wie auch rostral – sowie den prominenten Cristae des Os temporale nach lateral begrenzt.

Abbildung 2.2 - Knochenmodell: Modellerstellung anhand der Schwellenwertbestimmung, Ansicht von oben: antero-lateral nach posterior; Screenshot aus 3D Slicer v4.4.0

Die Segmentierung wurde mittels Schwellenwertbestimmung im *Editor*-Modul durchgeführt. Der große Dichteunterschied zwischen Knochen und Weichteilen ermöglichte eine genaue Differenzierung [20]. Die untere Schwelle betrug 47% des Maximalwerts, der die obere Grenze definierte.

Unter Verwendung der Checkbox *smooth model* wurde anhand der *Labelmap* ein geglättetes Knochenmodell erstellt und als STL-File exportiert. Abbildung 2.2 zeigt das fertige Knochenmodell.

2.6.2 Mesh-Modellierung

Die weitere Bearbeitung und Modellierung wurde mit einer *open-source* 3D Computergrafik Software (Blender v2.75a, Blender Foundation, Amsterdam) durchgeführt.

Anhand des bestehenden Knochenmodells wurde aufgrund der Form der Lücke, als auch der Krümmung des bestehenden Schädeldaches, auf die Gestalt des Implantats rückgeschlossen. Eine besondere Bedeutung wurde der natürlichen Krümmung der Schädelinnenseite beigemessen, um mögliche Druckstellen zu vermeiden. Die Oberfläche wurde aufgrund der kleinen Ausdehnungen des Implantats plan gestaltet, um das Druckverfahren entlang der Horizontalebene zu ermöglichen. Bei der Bearbeitung der Implantatränder wurde darauf geachtet, dass die Ränder konisch zulaufen, um ähnlich wie ein Korkeinsatz am Oberrand der Läsion zu ruhen.

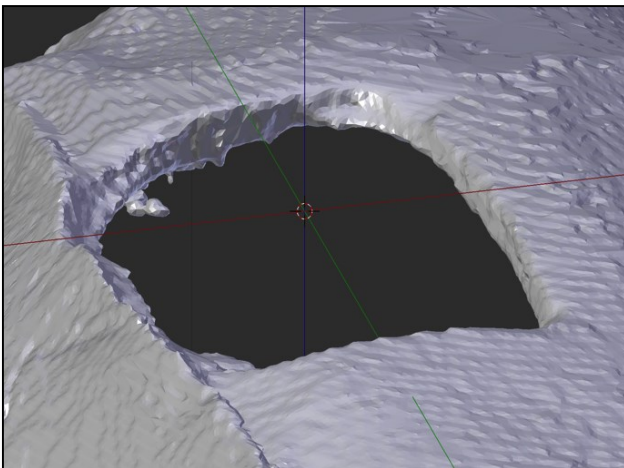


Abbildung 2.3 - Ausrichtung des Knochenmodells:
Ansicht von oben, antero-lateral nach posterior;
Screenshot aus Blender v2.75a

Zu diesem Zweck wurden primär drei Methoden etabliert und auf deren Anwendbarkeit hin untersucht. Hierbei erwies sich die manuelle Modellierung gegenüber der Spiegelung oder der Subtraktion mit präoperativ durchgeführten CT-Scans als geeignetste Methode (siehe Punkt 3.1.2).

Das importierte Modell wurde auf eine Weise orientiert, wonach die flächengrößte Ausdehnung der Läsion in der zwischen X- und Y-Achse aufgespannten Fläche zu liegen kam. Das Zentrum der Knochenlücke wurde dabei näherungsweise in den Schnittpunkt der drei Raumachsen gelegt (siehe Abbildung 2.3). Der 3D-Cursor wurde an ebendieser Intersektion belassen oder dorthin verschoben (Tastenkombination: *shift+c*). An dieser Stelle wurde eine Fläche mit den programmspezifischen Abmessungen von einer Blender-Einheit eingefügt.

Die vier Eckpunkte des Quadrates wurden in die jeweilige Ecke der Lücke verschoben. Eine geringe Überlappung zwischen den *Vertices* und dem Knochenmodell wurde angestrebt. Mit Hilfe der Funktion *Loop Cut and Slide* erfolgte die Unterteilung der Fläche in sechs längs gerichtete Segmente, deren Randpunkte wiederum mit dem Unterrand der Lücke übereingebracht wurden. Auf diese Weise konnte die Kontur der Schmalseite der

Läsion nachgestellt und eine konvexe Krümmung nach cranial erzielt werden. Schließlich erfolgte eine Sechsteilung der Längsseite. Die neu entstandenen Randpunkte wurden anhand der Knochenlücke ausgerichtet.

Die 25 Intersektionspunkte zwischen den 36 entstandenen Flächen wurden entlang der Raumachsen individuell verschoben, um die Krümmung des Schädeldaches in allen drei Richtungen nachzuempfinden.

Unter Auswahl aller Flächen erfolgte eine Extrusion entlang der Z-Achse bis zum Oberrand der Läsion. Schließlich wurden die Randpunkte der oberflächlichen Kontur angepasst und die nach oben hin begrenzenden Flächen durch Kreisauswahl (*keyboard c*) selektiert und schließlich entfernt, um lediglich den Oberrand auszuwählen (*border selection mode: Alt+Shift+right click*). Schließlich erfolgte eine Extrusion und konzentrische Skalierung der Selektion auf 110% der ursprünglichen Größe, wodurch eine konische Form gewährleistet wurde (Abbildung 2.4- A).

Der auf diese Weise entstandene Grundkörper erfuhr eine Subtraktion mit dem bestehenden Knochenmodell unter Verwendung des *Boolean-Modifiers*. Zu diesem Zweck erfolgte die Auswahl des als *Cage* bezeichneten Polygons. Im *Properties*- Panel wurde der *Modifier*-Reiter ausgewählt und ein *Object-Modifier* hinzugefügt. Als zu subtrahierender Gegenstand wurde das Knochenmodell ausgewählt. Die Einstellung *Difference* diente als Operationsmethode.

Überlappende Anteile zwischen dem Grundkörper und dem Knochen wurden auf diese Weise vom späteren Implantat entfernt (Abbildung 2.4- B). Der Status nach Durchführen der Subtraktion wurde als Rohform bezeichnet.

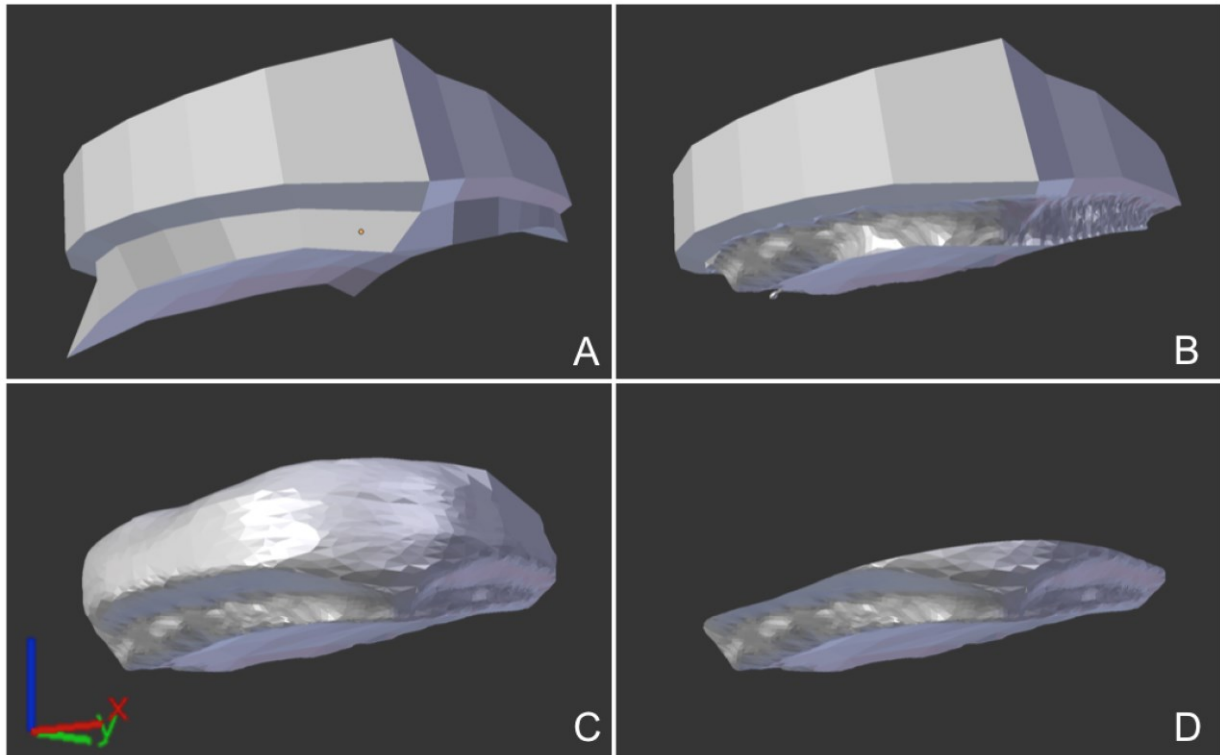


Abbildung 2.4 - Schrittweise Implantatgestaltung, Ansicht von antero-inferior, Screenshot aus Blender v2.75a
 A) Extrusion des Grundkörpers B) Darstellung des Implantatrandes nach Subtraktion mit dem Knochenmodell
 C) Fortschritt nach Anwendung der Modellierungstools D) fertiges Implantat nach Begradigung der Oberfläche;
 Q.: eigene Darstellung

Im *Sculpt*-Modus erfolgte eine weitere Adaptation der Ränder und des überreitenden Sockels. Die Spiegelung entlang der X-Achse wurde zu diesem Zweck deaktiviert. Unter Verwendung der Funktion *Enable Dyntopo* erfolgte die Auswahl der Bürste *F Scrape/Peak*. Die Brush-Size wurde mit 50 px, unabhängig vom Zoomfaktor, festgelegt. Der Wert der Stärke betrug 0,3. Der Parameter *Autosmoothing* erfuhr eine Anpassung auf 1 Prozent (0.01 [dimensionslos]) des möglichen Maximalwerts. Mittels *Scrape*-Effekt wurden Unregelmäßigkeiten entfernt und eine Umfangreduktion unter Berücksichtigung der Primärkontur erzielt (siehe Abbildung 2.4-C).

Zur Vermeidung scharfkantiger Ecken wurde der überreitende Sockel mittels ebengenannter Funktion abgerundet. Um nicht unnötig aufzutragen erfolgte schließlich eine Subtraktion mit einer möglichst schädelnahen Ebene.

Zur abschließenden Überprüfung wurde der *Boolean-Modifier* auf vorhin genannte Weise abermals angewandt. Die Operationsmethode *Intersect* lieferte hierbei Auskunft über möglicherweise während dem Modellierungsvorgang neu entstandene Überlagerungen zwischen dem Implantat und dem Knochenmodell. Unter Verwendung der Funktion *Remove Doubles* wurde das *Mesh* bereinigt. Des Weiteren wurde das Modell mit Hilfe der Funktion *Select Non Manifold* (Alt+Shift+ctrl+m) auf dessen Integrität untersucht und schließlich als STL-Datei gespeichert. Das fertige Modell ist in Abbildung 2.4-D dargestellt.

2.7 Implantatanfertigung

2.7.1 3D-Druck

Die Computermodelle der Implantate wurden dem Projektpartner und Sondermaschinenhersteller Hage GmbH auf elektronischem Weg übermittelt. Mit Hilfe eines adaptierten Spezialdruckers (HAGE3D-med, HAGE GmbH, Obdach) wurden jeweils drei Implantate ausgehend von derselben Vorlage im FDM-Verfahren gefertigt. Für die Herstellung der Implantate wurden Hochleistungspolymere in Spulenform herangezogen. Zur Anwendung kamen: Polypropylen (PP) (TECAPRO MT white, Ensinger, Nufringen) und Polyetheretherketon (PEEK) (TECAPEEK natural, Ensinger). Die Materialien wurden auf einer vakuumfixierten Platte aus dem jeweiligen Druckmaterial mit einer Schichtdicke von 0,15 mm aufgetragen. Der Algorithmus des Druckvorgangs wie auch die maschinenspezifischen Einstellungen waren Gegenstand der Untersuchungen der Firma HAGE.

2.7.2 Implantataufbereitung

Vor der Implantation wurden die Kunststoffimplantate 20 Minuten einer thermischen Sterilisation durch Dampfdruck bei 121° Celsius unterzogen (SPA FVA3, Fedegari Autoclavi, Albuzzano).

2.8 Datenerhebung und Analyse

2.8.1 Euthanasie & Organentnahme

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes der jeweiligen Gruppen wurden die Tiere zur Organbeurteilung euthanasiert. Analog zum operativen Vorgehen wurden die Versuchstiere einer Isofluran-Gasnarkose unterzogen. Es folgte die Entnahme von rund 1,5 ml Blut aus der Vena sublingualis [39]. Die Aufrechterhaltung der finalen Narkose erfolgte durch die intracardiale Injektion von 25 mg/0,5 ml Thiopental (Sandoz, Kundl). Die Wirksamkeit der Anästhesie wurde mittels palpatorischer Herzfrequenzeinschätzung und Setzen eines Schmerzreizes überprüft. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die neuerliche Messung der Körpermasse der Versuchstiere.

Es folgte die Öffnung des Brustkorbes und Darstellung des Herzens. Durch die Penetration der Herzspitze wurde eine 15 Gauge Knopfkanüle in den aufsteigenden Teil der Aorta eingebracht und fixiert. Unter Schonung der Aorta descendens wurde anschließend die Spitze der Auricula dextra entfernt. Als Fixationslösung diente eine 3,7% Formaldehyd-Lösung (Merck, Darmstadt), die blasenfrei eingebracht wurde. Der Perfusionsdruck betrug rund 110 cmH₂O (\triangleq 80,909 mmHg)[40]. Der Fixationsvorgang wurde bis zum vollständigen Sistieren spontaner Bewegungen durchgeführt.

Das Gehirn wurde behutsam aus dem Cranium entnommen. Anschließend erfolgte die makroskopische Betrachtung und Abtrennung des Cerebellums. Die Probe wurde in 30 ml 3,7% Formaldehyd-Fixationslösung in einem Spitzbodenröhrchen bei +4° Celsius gelagert. Nach 24 Stunden erfolgte eine ausgiebige Spülung mit PBS und die Einbettung in 20% Saccharose-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim). Nach Ablauf eines weiteren Tages wurde die Zuckerlösung durch ein frisches Solvat derselben Konzentration ersetzt. Die Lagertemperatur betrug +4° Celsius.

2.8.2 Mikrotomie und Immunhistochemische Färbungen

Nach einer Mindestlagerdauer von drei Tagen in der Zucker-Lösung wurden die entnommenen Organe für die mikroskopische Analyse weiter verarbeitet.

Das Teststück wurde aus der Konservierungslösung entnommen und mit 7-10ml Cryo-Spray (Medita, Burgdorf) bis zum Sistieren der Blasenbildung gefrierfixiert. In weiterer Folge wurde das Präparat basisnah in Tissue-Plus™ O.C.T. compound (Scigen Scientific Gardena, California) gebettet und exakt ausgerichtet. Zwischen 10 und 15 Serien zu je fünf *Slides* mit jeweils zwei 20µm dicken Schnittbildern wurden am Cryostat-Microtom (HM560M, Microm, Walldorf) bei -20° Celsius angefertigt. Die restliche Probe wurde vollständig in O.C.T.-Medium gebettet und in einem Spitzbodenröhrchen bei -20° Celsius gelagert. Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und die Analyse der histologischen Präparate waren nicht Gegenstand der eigenen Untersuchungen.

2.8.3 Operationsprotokoll

Zur Datenakquisition wurde ein Protokollblatt erstellt und für jedes Tier ausgefüllt. Neben den Identifikationmerkmalen des Tieres wurde das Gewicht vor der Operation und nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes erhoben. Die jeweilige Menge und der Zeitpunkt der Medikamentengabe beziehungsweise Operationsbeginn und -ende wurden notiert. Etwaige Besonderheiten im klinischen Verlauf wurden ebenfalls im Protokoll vermerkt.

2.8.4 Quantitative Auswertung

Die Analyse und Datenauswertung erfolgte unter Verwendung eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel for Mac 2011 v14.5.2, Microsoft, Redmond). Die deskriptive Statistik erforderte die Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung und Median durch die programmeigenen Funktionen.

Die analytischen statistischen Verfahren wurden mit IBM SPSS Statistics v22.0.0.0 (IBM, Armonk) durchgeführt. Zur Korrelationsanalyse wurde das Verfahren nach Spearman angewandt. Die Beurteilung zweier unabhängiger, nicht-parametrischer Variablen erfolgte durch den Mann-Whitney U-Test. Das Signifikanzniveau wurde in allen Fällen mit 95% festgelegt. Die Durchführung der statistischen Tests erfolgte stets zweiseitig.

3 Ergebnisse

3.1 Digitalisierung und Implantatgestaltung

3.1.1 Modellerstellung

Für die Erstellung des Knochenmodells wurden zwei unterschiedliche Prozesse gestaltet und evaluiert. Die erste Methode beschreibt den Vorgang auf Basis eines einzeitigen Bildgebungsverfahrens. Die Erstellung des Knochenmodells anhand einer zweizeitigen Bildgebung bedient sich zusätzlich der Registrierungsfunktion, um prä- sowie postoperative Bilder übereinzustimmen. Im Folgenden werden die Kennzahlen für die Erstellung der Modelle aufgezeigt.

Die angegebenen Zeiten beziehen sich auf die Dauer der Rechenvorgänge bei der Erstellung eines zu Anschauungszwecken erstellten Modells. Für die Methodenentwicklung wurden prä- sowie postoperative CT-Aufnahmen von zwei Ratten erstellt (siehe Punkt 2.2.1.).

3.1.1.1 Einzeitige Bildgebung

Die Erstellung des Knochenmodells erfolgte auf Basis der postoperativen CT-Aufnahmen des Schädelknochens. Der Vorgang umfasste zehn Schritten, die wiederum in drei Hauptaufgaben (1-3) subsumiert wurden. Abbildung 3.1 zeigt die schrittweise Erstellung des Knochenmodells.

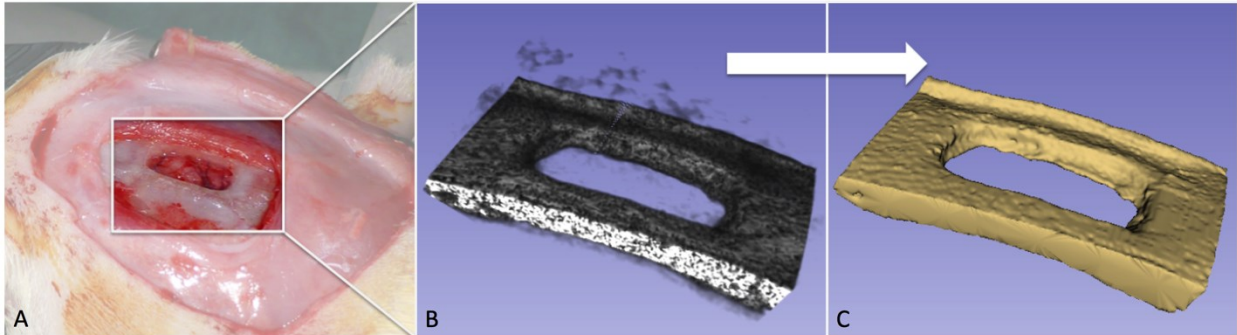


Abbildung 3.1 - Erstellung des Knochenmodells: Ansicht von postero-medial, B&C) Screenshots aus 3D-Slicer v4.4. A) intraoperative Aufnahme nach durchgeführter Kraniotomie B) Graustufendarstellung C) Modell anhand der Labelmap; Q.: eigene Darstellung

Punkt eins stellte die Datenvorbereitung (1) dar. Das Erstellen einer Verknüpfung mit dem DICOM-Verzeichnis aus der CT-Bildgebung dauerte 39 Sekunden. Der anschließende Import nahm eine Zeitspanne von 62 Sekunden in Anspruch. Für das Laden des *Volumes*-Moduls und die Übertragung des *Image-Spacing* Parameters in eine Excel Tabelle wurden 72 Sekunden benötigt. In Summe entspricht dies einer Vorbereitungszeit von 2 Minuten und 53 Sekunden.

Die Schwellenwertbestimmung (2) des Knochens konnte anhand der nativen Daten nicht durchgeführt werden und führte zu einem Programmabsturz. Der Versuch, den Datensatz durch Beschränkung auf ein kleineres Zielgebiet (siehe Punkt 2.6.1) zu reduzieren, resultierte ebenfalls in einem Programm-*Freeze*. Nach Anheben des *Image Spacing*-Parameters auf 175% des Ausgangswertes scheiterte der Begrenzungsvorgang nach 720 Sekunden. Durch Anheben der *Voxel-Size* um den Faktor acht (doppelte Kantenlänge) konnte die Einschränkung auf die ausgewählte Region und schließlich die Schwellenwertbestimmung durchgeführt werden.

Der Rechenvorgang für das *Resampling* der Daten mit doppeltem *Image-Spacing Parameter* und linearer Interpolationsmethode dauerte 352 Sekunden. Die Funktion *Crop-Volume* nahm 67 Sekunden in Anspruch. Insgesamt erforderte die Reduktion der Datengröße eine Dauer von 6 Minuten und 59 Sekunden.

Die Berechnung des Knochenmodells erfolgte in drei Schritten. Mittels Graustufenfilter wurde die Segmentierung des Knochens durchgeführt (siehe Abbildung 3.2). Hierbei erfolgt die Graduierung direkt proportional zum Röntgenstrahlen-Absorptionswert.

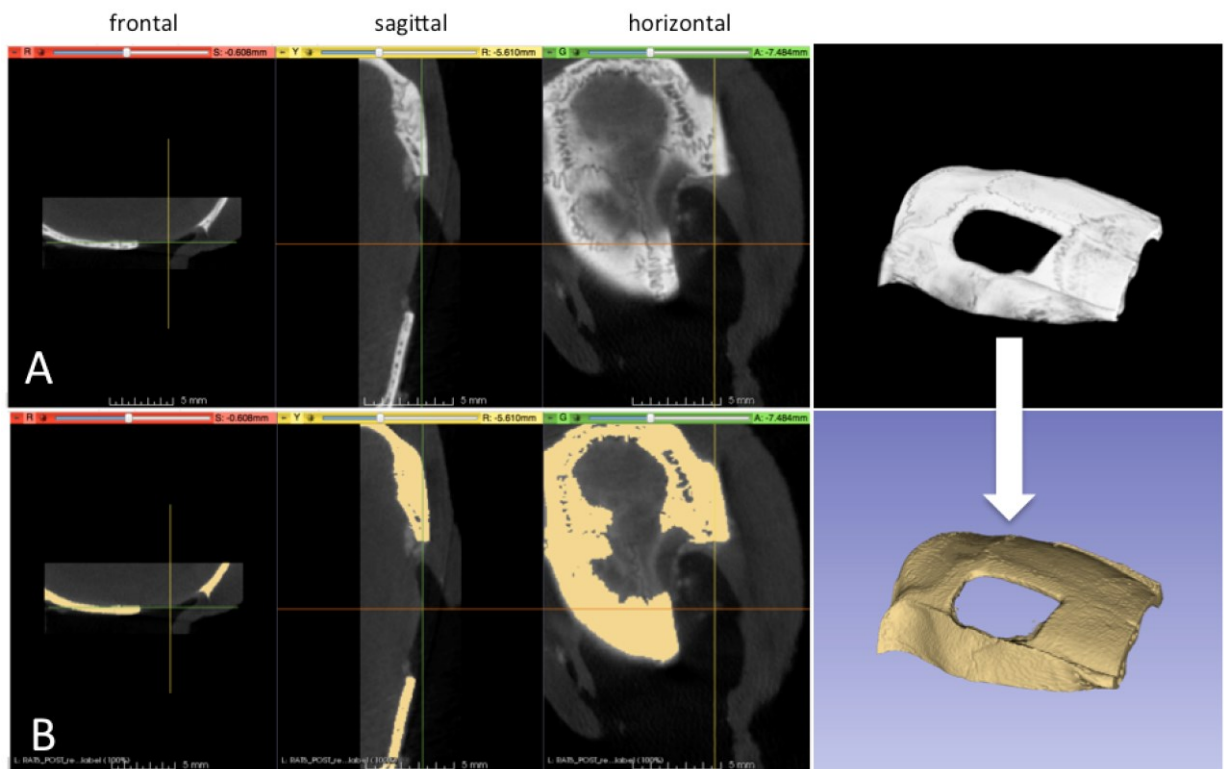


Abbildung 3.2 - Segmentierungsvorgang: selektive Darstellung ossärer Strukturen; Screenshots aus 3D-Slicer v4.4 A) native CT-Bilder B) überlagerte Label Map (ocker); Q.: eigene Darstellung

In einer selbständig durchgeführten Versuchsreihe erwies sich ein unterer Grenzwert von 47% des Maximalwertes als bester Kompromiss zwischen Detailreichtum und der Darstellung von Artefakten. Der Maximalwert wurde als oberer Schwellenwert angenommen. Abbildung 3.3 zeigt die unterschiedliche Abbildungsgenauigkeit bei den jeweiligen Schwellenwertbereichen (TR).

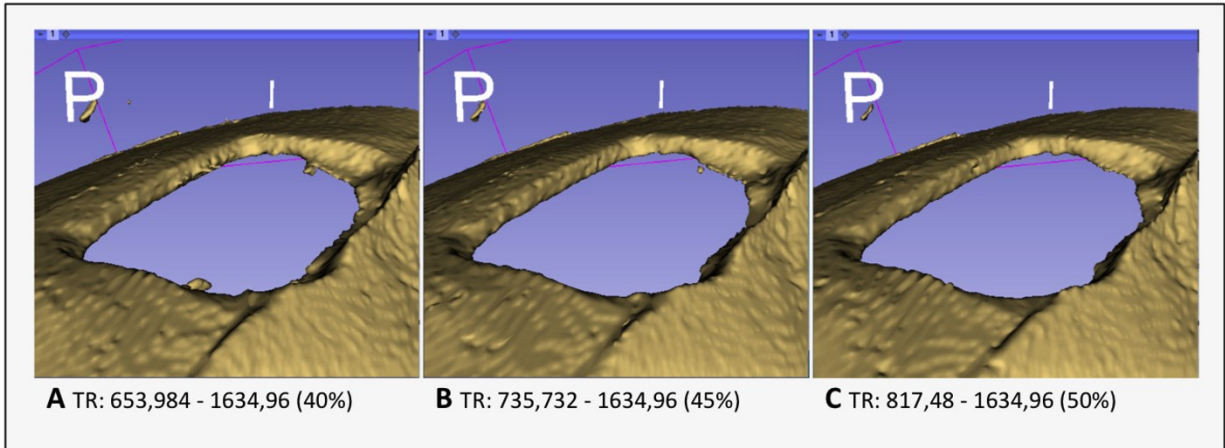


Abbildung 3.3 - Vergleich der Schwellenwerte: Ansicht von postero-lateral, Screenshots aus 3D-Slicer v4.4.0
 A) Abbildung spitzer Ausläufer, unregelmäßige Begrenzung des Knochendefekts; B) Diskontinuität der Ausläufer, Glättung der Begrenzung, guter Kompromiss; C) glatte Begrenzung, größter Umfang der Knochenlücke;
 Q.: eigene Darstellung

Die Durchführung der Schwellenwertbestimmung und die Erstellung der *Labelmap* dauerten insgesamt 45 Sekunden. Für das Erstellen des Knochenmodells wurden 15 Sekunden benötigt. Der Speichervorgang wurde nach 12 Sekunden beendet. In Summe erforderte die Erstellung des Modells eine Dauer von 11 Minuten und 4 Sekunden.

In der finalen Anwendung im Rahmen des Tierversuchs konnte in 18 von 20 Fällen mit diesem Verfahren ein geeignetes Modell erzeugt werden. Die untere Schwelle betrug im Mittel 807,2 (SD: $\pm 36,0$) [dimensionslos]. Der Mittelwert der Obergrenze von 1756,1 zeigte eine Standardabweichung von 151,1. In zwei Fällen wurde eine kleinere untere Schwelle angenommen (Modell RAT#33: 35%; Modell RAT#44: 45%).

3.1.1.2 Zweizeitige Bildgebung

In einem weiteren Ansatz wurde eine prä- sowie postoperative Computertomographie an einem Versuchstier durchgeführt. Die CT-Bilder der beiden Aufnahmen wurden mit 3D-Slicer registriert und exakt aneinander ausgerichtet. Der Registrierungsprozess nahm 7 Minuten und 24 Sekunden in Anspruch.

Tabelle 3.1 zeigt die ausgeführten Schritte, sowie deren zeitlichen Ablauf. Für die Erstellung beider Knochenmodelle wurden in Summe 29 Minuten und 34 Sekunden benötigt.

Tabelle 3.1 – Erstellung der Knochenmodelle Pre/Post in 3D-Slicer : Auflistung der Schritte und Zeitangaben;

PREPARATION			t [sec]	t [min]
Open Slicer			14	
Create Short Cut_ PRE			39	
Load Data_ PRE			68	
Create Short Cut_ POST			45	
Load Data_ POST			103	
ImageSpacing_ PRE	Load Volumes Module	copy original Voxel Size to Excel file	71	
Image Spacing_ POST	Load Volumes Module		83	
interim				7,05
RESAMPLING				
Resampling_ PRE	load Resample Scalar Volume Model		384	
	Enter Voxel Size, Interpolation Method	(ImageSpacing x2, linear)		
Saving_ PRE:resampled			49	
Resampling_ POST	load Resample Scalar Volume Model		351	
	Enter Voxel Size, Interpolation Method	(ImageSpacing x2, linear)		
Saving_ POST:resampled			53	
interim				13,95
REGISTRATION				
Reload_ PRE & POST	Display both, Opacity 50%		20	
Manual Affine	Load Data Module	Create/Rename new transform Node Drag POST into new Node	198	
	Load Transforms Module	approximate slides		
Registration	Load General Registration (BRIANS) Module	Set Fixed: PRE, Moving: POST Initialization transform: "name of created Node" Check: Rigid, Affine	191	
interim				7,4
BONE MODEL				
Crop Volumes PRE & POST_registred			25	
Saving both			10	
Make Model both	Load Editor Module		60	
	Select Treshold [(47% of max) to max]			
Saving both			10	
interim				1,75
total				29,57

3.1.2 Modellierungsmethoden

Es wurden drei unterschiedliche Methoden zur Implantatgestaltung angewandt und auf deren Anwendbarkeit überprüft. Die jeweiligen Zeiten des Gestaltungsvorganges wurden nach der Erprobung des Modellierungsvorgangs unter Verwendung desselben Knochenmodells (siehe Punkt 2.2) im Einzelversuch erhoben.

3.1.2.1 Methode 1: Mirror

In einem ersten Ansatz wurde das vorhandene Knochenmodell dupliziert und entlang der Mittellinie gespiegelt [9,14,16]. Im Folgenden wird diese Herangehensweise als *Mirror* bezeichnet. Die Ausrichtung des Knochenmodells, dessen Spiegelung und die erneute Orientierung des Spiegelbildes benötigte in Summe 215 Sekunden. Durch Spiegelung konnte eine näherungsweise Übereinstimmung der Schädelkrümmungen erzielt werden. Asymmetrien und Dickenunterschiede erschwerten diesen Vorgang. In einer Versuchsreihe mit drei weiteren Schädelmodellen ließ sich dieses Ergebnis reproduzieren. Das tatsächliche Modell wurde von dessen Spiegelbild abgezogen, um die Positivform des Implantats zu erhalten (siehe Abbildung 3.4). Der Gestaltungsvorgang bis zur Rohform (siehe 2.6.2) umfasste elf Schritte mit einer Durchschnittsdauer von je 37 (SD: ± 45) Sekunden – resultierend in einer Gesamtzeit von 6:45 [mm:ss].

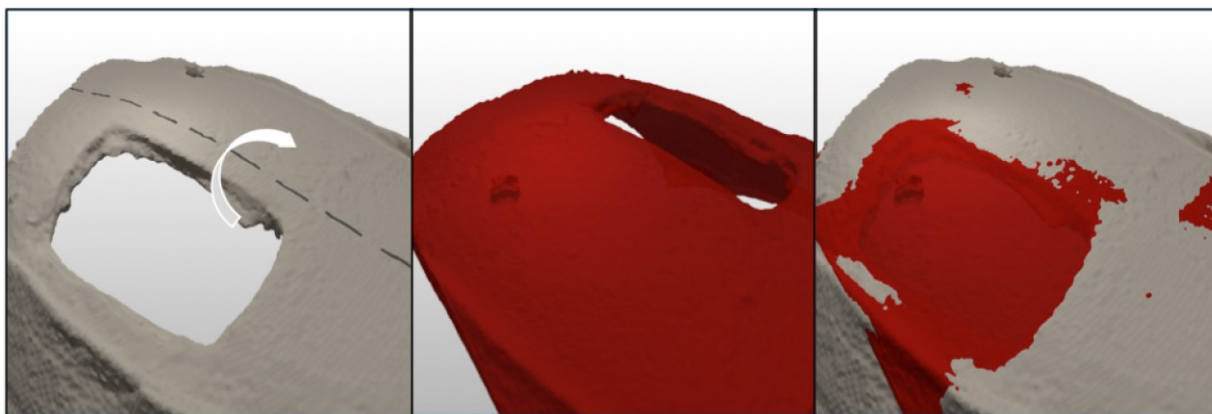


Abbildung 3.4 – Methode 1: Mirror, Ansicht von antero-lateral, Renderings aus Blender v2.75a; Q.: eigene Darstellung

3.1.2.2 Methode 2: Cage

Die manuelle Gestaltung der inneren Krümmung durch händische Adaptation eines Polygons wurde als *Cage* bezeichnet (siehe 2.6.2). Im Gegensatz zur Methode 1 – Mirror konnte eine genauere Übereinstimmung der inneren Krümmung beobachtet werden. Bis zum Abschluss der Subtraktion mit dem postoperativen Knochenmodell wurden sieben Schritte durchgeführt. Die mediane Dauer betrug 20 (\bar{x} = 100; SD: \pm 227) Sekunden. Auf die Gestaltung des Polygons entfielen hierbei 660 Sekunden. Die Gesamtzeit betrug 13 Minuten und 17 Sekunden. Abbildung 3.5 zeigt den schrittweisen Gestaltungsprozess.

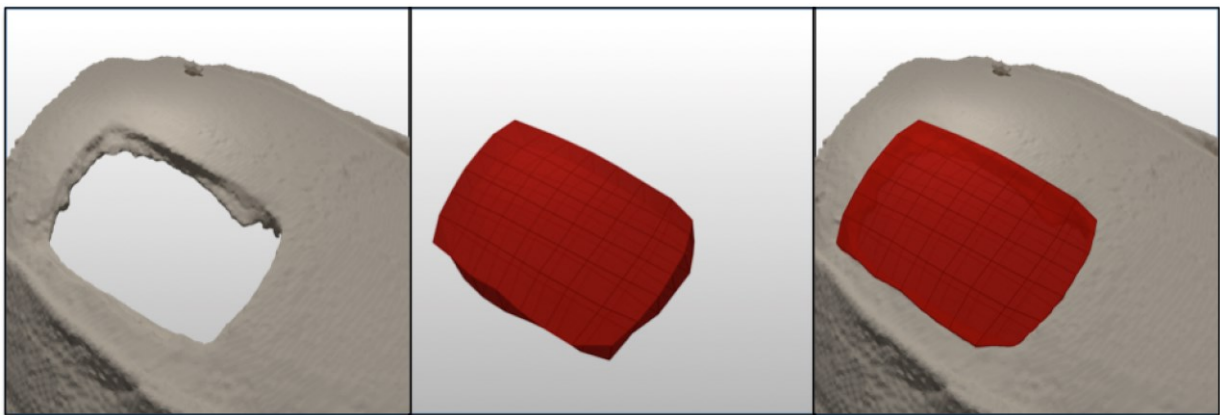


Abbildung 3.5 - Methode 2: Cage, Ansicht von antero-lateral, Renderings aus Blender v2.75a; Q.: eigene Darstellung

3.1.2.3 Methode 3: Pre/Post

Der Modellierungsvorgang bis zur Rohform des Implantates umfasste 10 Schritte mit einer durchschnittlichen Dauer von 32 (SD: \pm 24) Sekunden. Die Ausrichtung der beiden Knochenmodelle durch vorherige Registrierung zeigte eine exakte Übereinstimmung der Schädelkrümmungen. Für die Anordnung im Raum wurden insgesamt 51 Sekunden aufgebracht. Die Subtraktion zwischen dem postoperativen Knochenmodell und dem präoperativen Zustandsbild nahm mit einer Rechendauer von 60 Sekunden den größten Teil der Bearbeitungszeit in Anspruch. In Summe erforderte die Vorgehensweise einen Zeitaufwand von 5 Minuten und 23 Sekunden. Der Entstehungsvorgang ist in Abbildung 3.6 dargestellt.



Abbildung 3.6 - Methode 3: Pre/Post, Ansicht von antero-lateral, Renderings aus Blender v2.75a; Q.: eigene Darstellung

3.1.2.4 Finishing der Methoden

Etwaige Alveolen, welche im Zuge der Kraniotomie eröffnet wurden, blieben nach der Subtraktion als schmalbasige Ausläufer am Implantatrand zurück (siehe Abbildung 3.7).

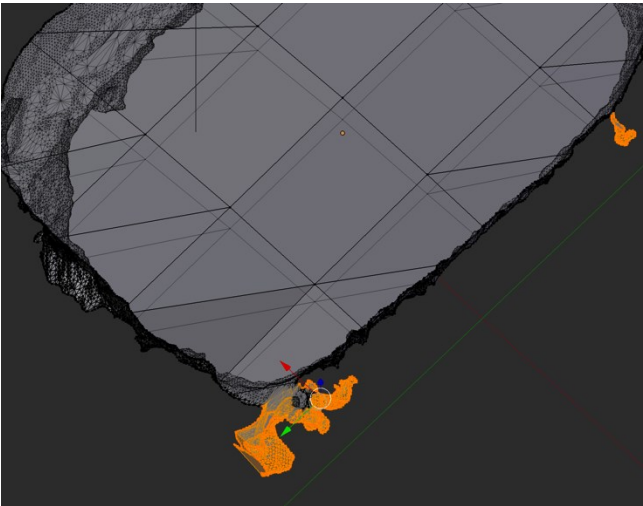


Abbildung 3.7 – Implantatränder: schmalbasige Ausläufer nach Durchführung des Subtraktionsvorgangs; Screenshot aus Blender v2.75a

Aufgrund der resultierenden Umfangssteigerung wurde eine mögliche Einbettung in den Defekt als nicht durchführbar angenommen. Die Ausläufer wurden infolge dessen entfernt. Der abschließende Adaptationsprozess der Implantatränder, wie in Punkt 2.6.2 beschrieben, wurde für alle drei Methoden auf dieselbe Weise durchgeführt und dauerte 10 Minuten.

Die finale Form der unterschiedlich gefertigten Implantatmodelle ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

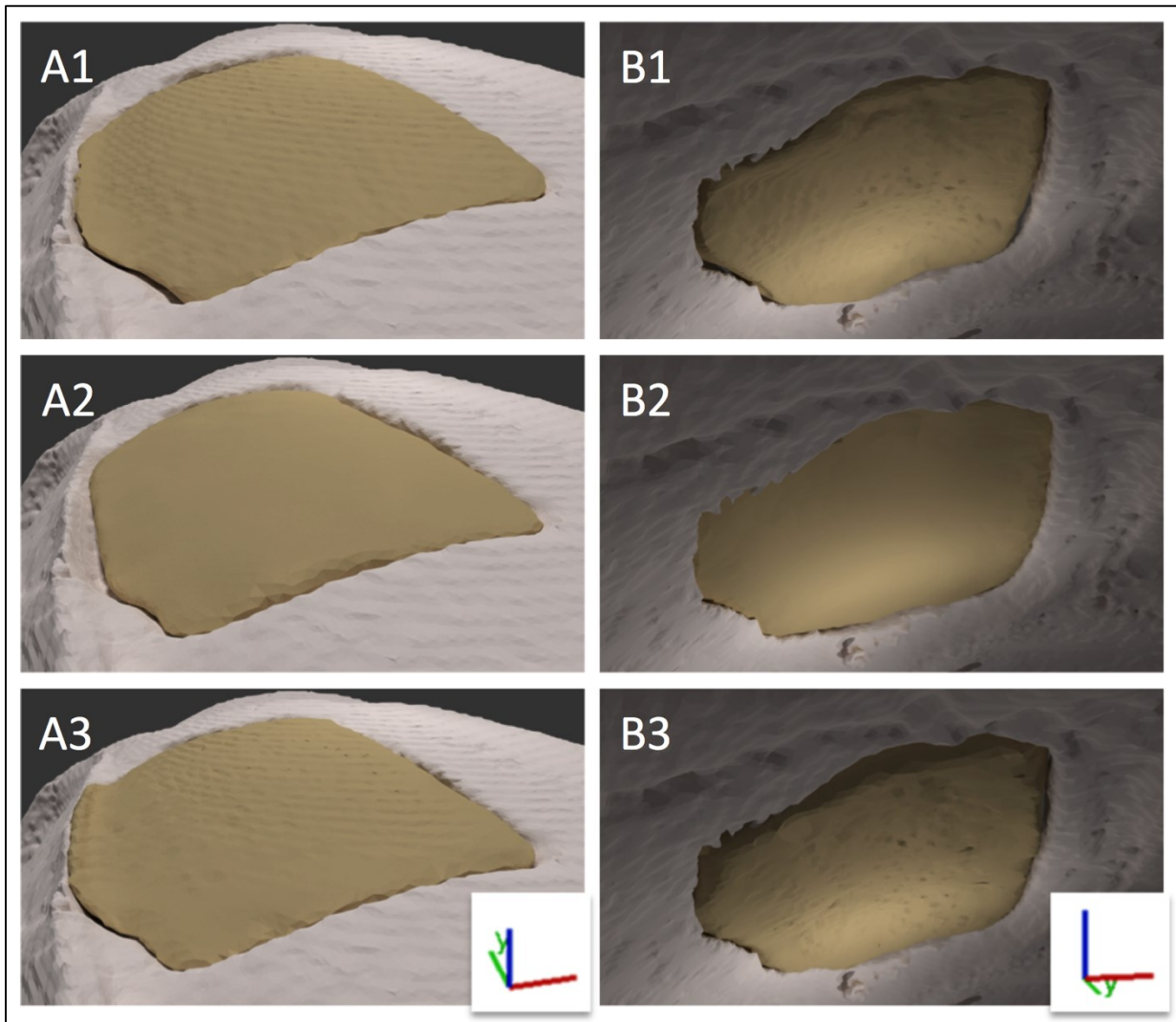


Abbildung 3.8 - Vergleich der Modellierungsmethoden, Renderings aus Blender v2.75a, Ansicht von oben: antero-lateral nach posterior (jeweils links), Ansicht von unten: antero-medial nach posterior (jeweils rechts); A1&B1) Methode 1: Mirror A2&B2) Methode 2: Cage A3&B3) Methode 3: Pre/Post; Q.: eigene Darstellung

3.1.3 Methodenwahl

Als Anforderungen an eine geeignete Modellierungsmethode wurden eine hohe Passgenauigkeit, interexemplarische Reproduzierbarkeit und eine rasche Durchführungsdauer definiert.

3.1.3.1 Dauer

Die Gesamtdauer des Translationsprozess umfasst die benötigte Zeit für die Bildgebung, die Dauer der Rekonstruktion der Daten, die Knochenmodellerstellung, die Modellierung der Rohform und die Adaptation der Ränder. Die drei erstgenannten Schritte werden in weiterer Folge als Vorbereitung bezeichnet. Die Modellierung der Rohform und die Adaptation der Ränder werden unter dem Begriff Implantatgestaltung zusammengefasst.

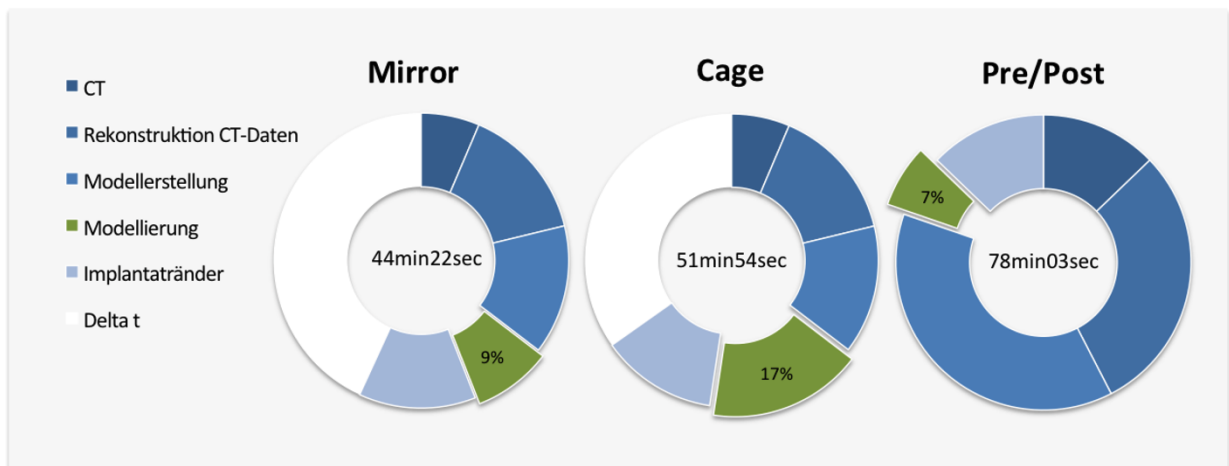


Abbildung 3.9 - Translationsdauer: Anteil der jeweiligen Prozesse an der Gesamtzeit, Delta t: Differenz zur Maximalzeit; Q.: eigene Darstellung

Im Schnitt benötigte der Translationsprozess 57 Minuten und 46 Sekunden (SD: $\pm 17\text{min}52\text{sec}$). Die Durchführung mit Methode 1 – *Mirror* dauerte 44 Minuten und 22 Sekunden. Methode 2 – *Cage* zeigte eine Steigerung der Bearbeitungsdauer um 14,72% gegenüber der erstgenannten Methode ($t=51\text{min}54\text{sec}$). Der größte Zeitaufwand entfiel auf Methode 3 – *Pre/Post*. In Summe wurden 78 Minuten und 3 Sekunden für den Translationsprozess mit Methode 3 benötigt. Dies entspricht einem Mehr von 75,92% ($\Delta t=33\text{min}41\text{sec}$) gegenüber Methode 1 bzw. 53,34% ($\Delta t=27\text{min}9\text{sec}$) gegenüber

Methode 2. Zweiundsechzig Minuten und 40 Sekunden der Gesamtzeit entfielen auf vorbereitende Maßnahmen. Die Vorbereitungszeiten von Methode 1 und Methode 2 waren ident (t=27min37sec). Das Verhältnis zwischen Vorbereitung und Implantatgestaltung betrug rund 1: 0,60 für Methode 1, beziehungsweise 1: 0,84 für Methode 2. Abbildung 3.9 zeigt die Aufschlüsselung in die Teilbereiche der jeweiligen Methoden.

3.1.3.2 Unterschiede

Im Folgenden werden die Beobachtungen während des Gestaltungsprozesses angeführt. Die Gegenüberstellung der jeweiligen Modellierungsmethoden ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2 - Gegenüberstellung der Modellierungsmethoden: beobachtete Vor- und Nachteile

	Pro	Contra
Mirror	einzeitige Bildgebung, vorhandene Oberflächenstruktur, natürliche Krümmung, schnellste Translation	fehlende Symmetrie nur bei unilateralen Läsionen einsetzbar komplizierte Subtraktion fehleranfällig
Cage	einzeitige Bildgebung, hohe Variabilität, Möglichkeit der Simplifizierung	manuelle Anpassung, höchste Gestaltungsdauer
Pre/Post	automatisierte Überlagerung originale Oberflächenstruktur, einfache Berechnung, geringste Gestaltungsdauer	zweizeitige Bildgebung, zeitintensiver Registrierungsprozess, höchster absoluter Zeitaufwand

3.1.4 Implantatevaluierung

Die Überprüfung der Anwendbarkeit und Passgenauigkeit erfolgte an Implantat-Prototypen (siehe Punkt 2.2.1). In der Beurteilung der Probeimplantate wurden 13 der 30 getesteten Knochenersatzstücke sowohl von Seiten der Passform, als auch in Bezug auf die Unterfläche mit mindestens fünf Punkten eingeschätzt.

Abbildung 3.10 zeigt die Verteilung der Anwendbarkeit (Passgenauigkeit und Unterfläche ≥ 5) bezüglich des verwendeten Materials und anhand der Modellierungsmethode. Die Passform wurde auf der zehnstufigen Skala im Mittel mit 5,0 (SD: $\pm 1,7$) bewertet. 23 Fälle zeigten hierbei einen Wert größer-gleich fünf. Die

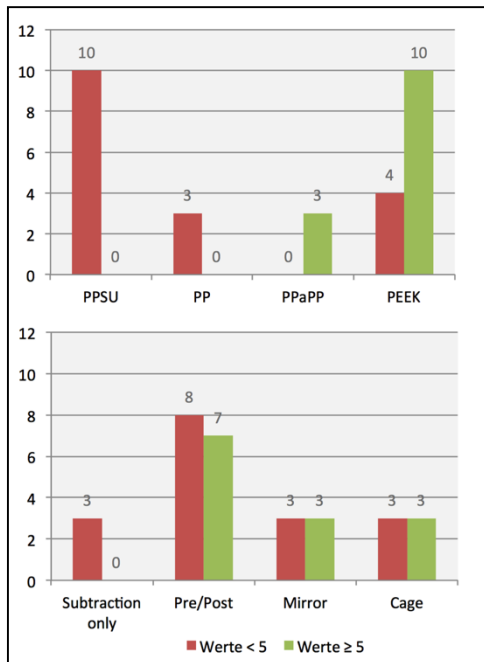


Abbildung 3.10 - Implantatevaluierung: Aufschlüsselung der Schwellenwertbereiche nach Material und Modellierungsmethode;

Unterfläche erhielt durchschnittlich einen Wert von 4,9 (SD: $\pm 0,8$). In einem Drittel der Fälle wurde die Kontaktfläche mit der Dura mater mit einem Wert kleiner als fünf bewertet.

Den größten Durchschnittswert der Gesamtbewertung zeigten die Implantate aus Poly-propylen, die auf einer Platte aus demselben Material gefertigt wurden (PPaPP; $n=3$). Der Mittelwert aus Passgenauigkeit und Unterfläche beträgt 5,8 (SD: $\pm 0,3$). Die Implantate aus PEEK ($n=14$) wiesen einen durchschnittlichen Wert von 5,4 (SD: $\pm 0,8$) auf. Der Mittelwert der Gesamt-bewertung von PP ($n=3$) und PPSU ($n=10$) lag bei beiden Materialien unter fünf (PP: $\bar{x}=3,0$; SD: ± 0 bzw. PPSU: $\bar{x}=4,8$; SD: $\pm 0,3$).

Methode 1 – Mirror ($n=6$) erzielte von den Modellierungsmethoden den größten Durchschnittswert in der Gesamtbewertung ($\bar{x}=5,3$; SD: $\pm 0,9$). Methode 2 – Cage ($n=6$) wies einen Mittelwert von 5,2 (SD: $\pm 0,6$) auf. Methode 3 – Pre/Post ($n=15$) und die Implantate ohne Adaptation der Ränder (*Subtraction only*; $n=3$) zeigten beide Durchschnittswerte unter fünf (Pre/Post: $\bar{x}=4,9$; SD: $\pm 1,1$ bzw. *Subtraction only*: $\bar{x}=4,5$; SD: ± 0).

3.1.5 Finale Implantatgestaltung

Methode 2 – Cage wurde als Modellierungsmethode für die Implantatgestaltung gewählt. Im Vergleich zu Methode 1 – Mirror bietet diese Gestaltungsmethode bei ähnlicher Translationsdauer und Passgenauigkeit den Vorteil, unabhängig von Lokalisation und Ausdehnung der Kraniotomie, durchführbar zu sein.

Die Modellierung der Druckvorlagen erfolgte in allen 20 Fällen des Tierversuchs mit der genannten Methode. Sämtliche Gestaltungsvorgänge konnten auf diese Weise erfolgreich durchgeführt werden.

3.1.5.1 Gestaltungsdauer

Es wurde eine mediane Implantatgestaltungsdauer von 24,5 ($\bar{x}=26$; SD: $\pm 7,8$) Minuten registriert. Dies entspricht 105,23% des beobachteten Werts in der Untersuchung der Methoden. Abbildung 3.11 zeigt die Bandbreite der benötigten Zeit für die Implantatgestaltung bei insgesamt 20 erstellten Implantat-Modellen. Modell 1 (43 min) und Modell 4 (44 min) zeigten eine außergewöhnlich lange Gestaltungsdauer.

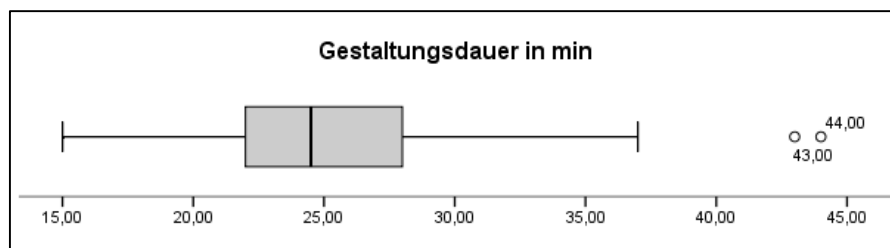


Abbildung 3.11 - Boxplot: Bandbreite der Gestaltungsdauer, n=20;

Mit zunehmender Anzahl der modellierten Implantate zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Bearbeitungsdauer in der Korrelationsanalyse nach Spearman ($r=-0,818$; $p<0,001$).

3.1.5.2 Speicherplatzbedarf

Die Deduktion von der Defektsituation hin zum dreidimensionalen Implantatmodell erfolgte in fünf Schritten. Mittels Computertomographie und anschließender Rekonstruktion wurde eine mittlere Datenmenge von 4,44 GB generiert (SD: $\pm 0,003$). Durch Verdoppelung des *Image Spacing*-Parameters sowie lineare Interpolation wurde mittels *Resampling* eine Reduktion des Speicherplatzes um 90,62% erzielt ($\bar{x}=416,10$; SD: $\pm 18,96$ MB). Die Begrenzung des Gesamtvolumens auf einen definierten Zielbereich bewirkte eine weitere Abnahme der Datenmenge um durchschnittlich 386,66 (SD: $\pm 36,67$) MB. Dies entspricht einer Reduktion um weitere 92,36%.

Die Knochenmodellerstellung und die damit einhergehende Konversion in das STL-Format lieferte Daten mit einem durchschnittlichen Speicherbedarf von 7,64 (SD: $\pm 4,93$) MB. Die Information für die fertigen Druckvorlagen wurde schließlich in durchschnittlich 670,18 (SD: $\pm 315,08$) KB codiert. Im Vergleich zum Ausgangswert entspricht dies einem Anteil von 0,151%. Der Korrelationskoeffizient zwischen der Modifikationsstufe und der Datengröße beträgt 0,971. Der Zusammenhang ist höchst signifikant ($p < 0,001$). Die Abbildung 3.12 liefert einen schematischen Überblick über den Verlauf des Speicherbedarfs während des Translationsprozesses.

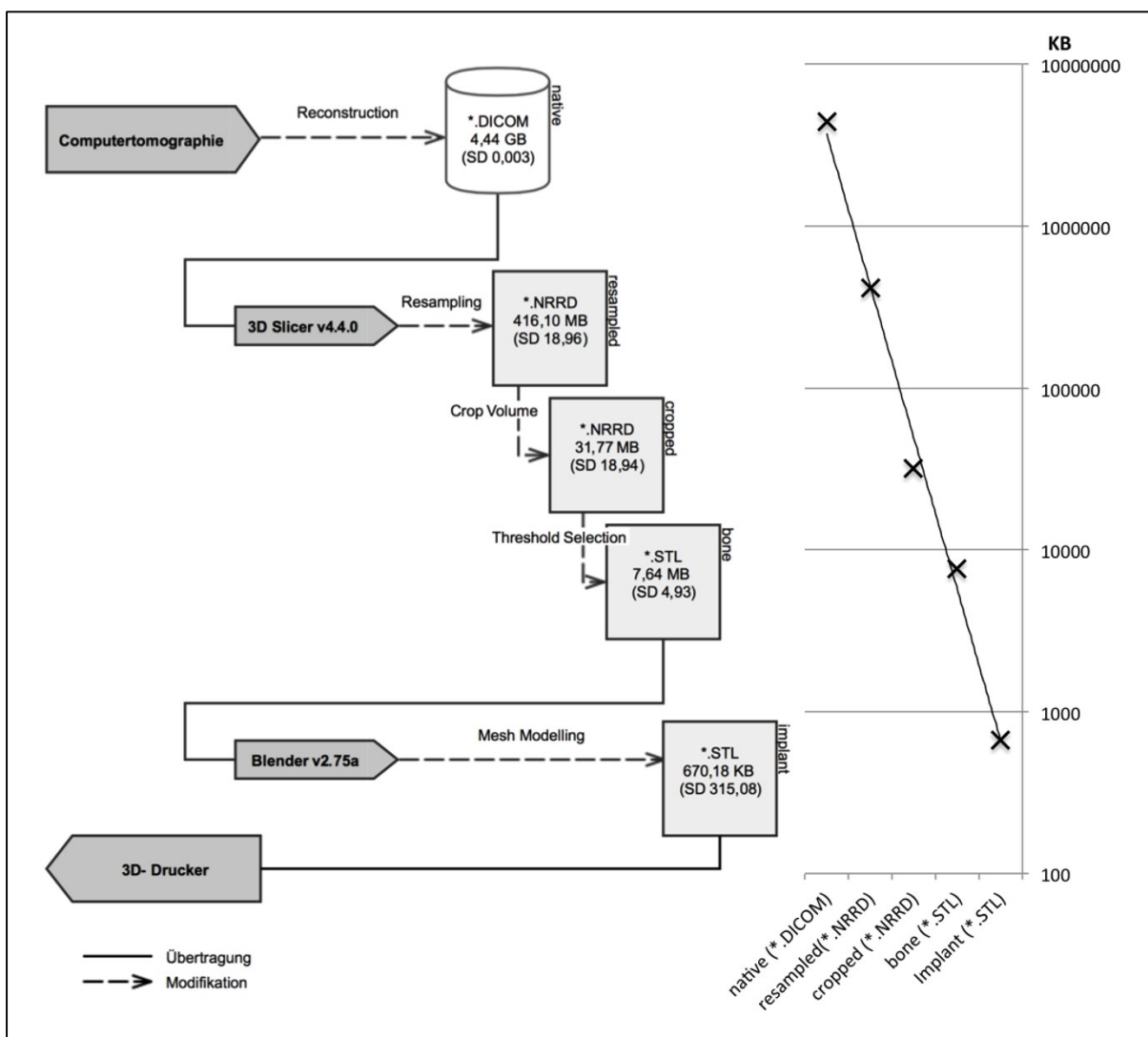


Abbildung 3.12- Extraktion des Informationsgehalts, Übersicht über die Entwicklung des Speicherbedarfs von der CT-Bildgebung hin zum Implantat-Modell; Q.: eigene Darstellung

3.2 Versuchsverlauf

3.2.1 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe wurde im Laufe der Untersuchungen um ein Tier ergänzt. Nach Entwicklung eines Tumors im Bereich der rechten unteren Extremität wurde die Ratte euthanasiert und der *Healthy Control* Gruppe zugeordnet. Im Gegenzug wurde ein Tier in die Gruppe *Glue-Control 2 weeks* transferiert.

3.2.2 Operationsverlauf

Insgesamt wurde an 36 Versuchstieren eine Kraniotomie durchgeführt (siehe 3.2.1). Bei elf Tieren wurde der Knochen schlitzförmig eröffnet. Fünfundzwanzig Ratten erhielten eine Kraniotomie zur Entnahme eines Knochendeckels. In drei Fällen kam es zu einer Penetration der harten Hirnhaut während des Bohrvorganges, was zum Ausschluss der Ratten führte (PEEK5dII: n=2; PEEK2wII: n=1). Die Wiederherstellung der Gruppengröße erfolgte mit Tieren aus der Gruppe *Self-Implant 5 days* (SI5d), wodurch nur zwei Ratten einer Kranioplastie mit autologem Knochen unterzogen wurden.

Die durchschnittliche Dauer für die schlitzförmige Kraniotomie betrug 27 Minuten und 55 Sekunden (SD: $\pm 9\text{min}57\text{sec}$) vom Zeitpunkt des Hautschnittes bis zum vollständigen Wundverschluss. Der gesamte Vorgang zur Entnahme des Knochendeckels nahm eine mittlere Dauer von 42 Minuten und 51 Sekunden (SD: $\pm 14\text{min}06\text{sec}$) in Anspruch. Mit fortschreitender Fallzahl zeigte sich keine signifikante Reduktion der Operationsdauer ($r = -0,293$; $p > 0,05$). Das verabreichte Narkosevolumen ($\bar{x} = 0,8$; SD: $\pm 0,2$ ml) stand in keiner signifikanten Abhängigkeit zur Operationsdauer ($r = -0,075$; $p > 0,05$). Die Antagonisierung erfolgte in sämtlichen Fällen mit 0,5 ml AAN.

In den 48 Stunden zwischen der Erstoperation und der Implantation der FDM-gedruckten Knochenersatzstücke zeigte keines der Tiere auffällige neurologische Symptome oder besondere Anzeichen von Lahmheit. Die perioperative Mortalität nach der Kraniotomie betrug 0% (0 von 33). In zwei Fällen wurde eine sekundäre Dehiszenz der Wundränder durch eigenständige Entfernung der Nähte am ersten postoperativen Tag beobachtet.

Zusätzlich zur Standarddosis von 10mg/kgKG Carprofen am ersten postoperativen Tag wurde in keinem der Fälle eine weitere Schmerzmedikation verabreicht.

Die Kranioplastie konnte bei allen Tieren in der Gruppe mit FDM-gedruckten Implantaten zwei Tage nach der Entfernung des Knochendeckels erfolgreich durchgeführt werden.

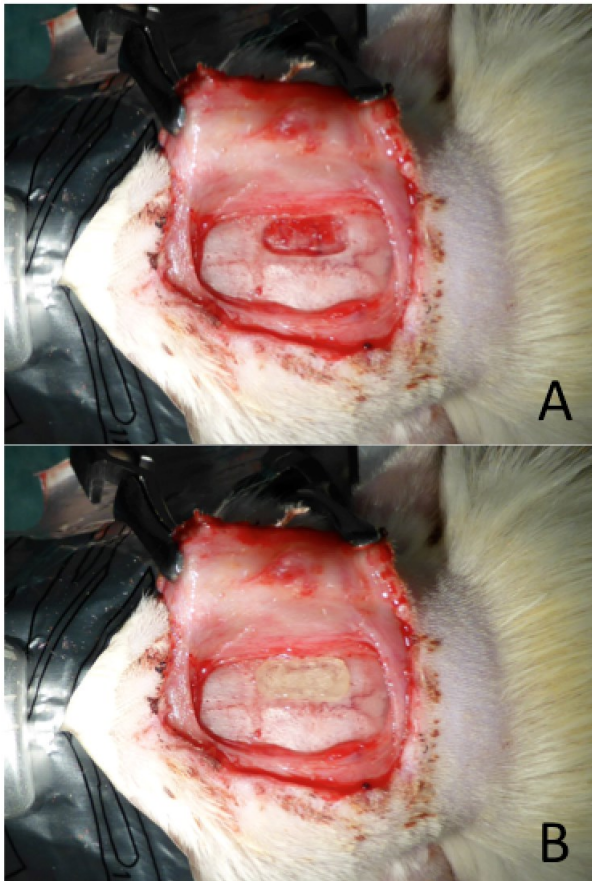


Abbildung 3.13 - Passgenauigkeit: intraoperative Aufnahmen A) vorher B) nach der Implantation

Das verabreichte Narkosevolumen betrug im Mittel 0,66 (SD: $\pm 0,15$) ml. In keinem Fall wurden Hinweise auf eine Infektion des Wundgebiets gefunden. Die Dura mater stellte sich durchwegs glattglänzend mit abspülbaren blutigen Auflagerungen dar.

Sämtliche Implantate wiesen eine entsprechende Passform wie auch Unterflächenbeschaffenheit auf. Keines der Implantate erforderte eine intraoperative Adaptation. Abbildung 3.13 zeigt die Verhältnisse vor und nach der Implantation.

In allen Fällen konnten die Implantate ohne makroskopisch sichtbare Verletzung der Dura mater eingesetzt werden. Im

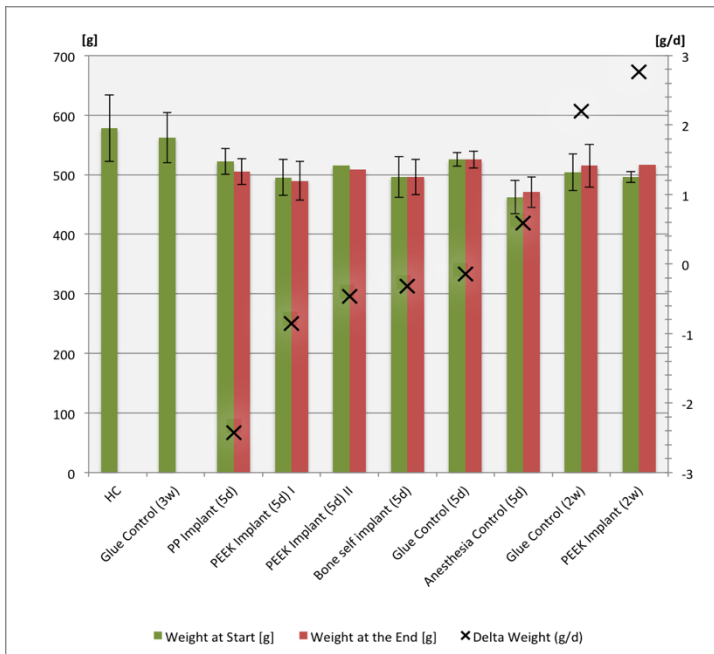
Mittel nahm die Re-Operation eine Dauer von 18 Minuten und 11 Sekunden (SD: $\pm 6\text{min}02\text{sec}$) in Anspruch. Es bestand keine signifikante Abhängigkeit zwischen der Anzahl der durchgeführten Operationen und der Dauer des Vorgangs ($r=-0,25$, $p>0,05$). Die Menge des verabreichten Narkosegemisches zeigte ebenfalls keine signifikante Korrelation zur Operationsdauer ($r=0,316$, $p>0,05$). Die Antagonisierung erfolgte in sämtlichen Fällen mit 0,1 ml/kgKG AAN.

3.3 Klinischer Verlauf

Bei der täglichen Kontrolle der Versuchstiere wurden zu keinem Zeitpunkt auffällige neurologische Symptome oder Anzeichen einer Lahmheit festgestellt. Bei fünf Ratten zeigten sich eine etwa 1 cm große kreisrunde Rötung und eine Schwellung, sowie Fellverlust im Bereich der Injektionsstelle am Tag nach der Carprofen-Administration (Gruppe PEEK5dII). Drei Tiere wiesen eine sekundäre Wunddehiszenz am ersten postoperativen Tag durch eigenständige Entfernung der Wundnähte auf (GC2w: n=1; PEEK2w: n=1; PEEK5dII: n=1).

Im Laufe der klinischen Kontrolle (\bar{x} =9; SD: \pm 4 Tage) zeigten sämtliche Tiere einen vollständigen Wundverschluss ohne Anzeichen einer Infektion. Im gesamten Beobachtungszeitraum wurde kein unerwartetes Ableben beobachtet. Die postinterventionelle Überlebensrate betrug 100% (43 von 43). In dem allgemeinen Beobachtungszeitraum zeigten 17 Tiere einen Gewichtsverlust von durchschnittlich 9 (SD: \pm 6) g. Bei 15 Tieren wurde eine mittlere Zunahme der Körpermasse um 12 (SD: \pm 10) g registriert.

Abbildung 3.14 zeigt den Verlauf des Körpergewichts innerhalb der jeweiligen Gruppen.



Keine Fraktion zeigte eine signifikante Änderung der Körpermasse zwischen dem Zeitpunkt vor der Intervention und dem Ende des Beobachtungszeitraums. Ein Vergleich innerhalb der Versuchsgruppen ist aufgrund der stark variierenden Masse zum Operationszeitpunkt und des unterschiedlichen Beobachtungszeitraums nicht möglich.

Abbildung 3.14 - Körpermasse vor und nach der Intervention; Sekundärachse: durchschnittliche Änderung pro Tag (g/d)

3.3.1 Fünf Tage Follow-Up

Die Gruppe *Anesthesia Control 5 days* wies keine makroskopischen Besonderheiten zum Zeitpunkt der Euthanasie auf. Im Durchschnitt wurde eine Körpermassenzunahme von 8 (SD: ± 8) g festgestellt.

Die Versuchstiere der Gruppe *Glue Control 5 days* wiesen eine mittlere Abnahme der Körpermasse um 1 (SD: ± 5) g auf. Bei der Inspektion der Klebestelle entleerten sich in allen fünf Fällen einige Tropfen blutig-seröser Flüssigkeit. Der Kleber zeigte sich stets an der eingebrachten Stelle. Die Entfernung gelang in allen Fällen durch Unterminieren und Anheben mit Hilfe einer Spitzpinzette mit minimalen Anstrengungen. Nach der Entnahme des Cerebrums zeigte sich in zwei Fällen eine longitudinale Impression im Bereich der Kontaktfläche zwischen Kleber und Dura mater.

Bei der Darstellung des Implantats kam es in sämtlichen Fällen zum Austreten von 10-20 μ l blutig-seröser Flüssigkeit. Die Galea, sowie das umliegende Gewebe zeigten keine Anzeichen von Schwellung oder Verdickung. An der Kontaktfläche zwischen Cutis und dem Implantat wurden keine sichtbaren Auffälligkeiten bemerkt. In keinem der Fälle wurde eine Lockerung oder Dislokation der Implantate bemerkt. In der makroskopischen Beurteilung der Hirnoberfläche wurden keine Seitendifferenzen festgestellt.

Die Tiere aus der Gruppe *Self Implant 5 days* zeigten im Mittel eine Reduktion der Körpermasse um 7 (SD: N/A) g. Die Ansicht von innen zeigte keinen Kontakt zwischen den Knochenstücken und der Dura mater. In beiden Fällen wurde der autologe Knochenspan vollständig von Spezialkleber umgeben.

3.3.2 Zwei Wochen Follow-Up

Zwei Wochen nach Einbringen des Klebers zeigten alle Tiere der Gruppe *Glue Control 2 weeks* eine Zunahme der Körpermasse ($\bar{x}=11$; SD: ± 7 g). Das Wundsekret schien in sämtlichen Fällen vollständig resorbiert worden zu sein. Der Kleber befand sich stets an der eingebrachten Stelle und ließ sich sehr leicht entfernen. Die Betrachtung der Hirnoberfläche zeigte bei keinem der Versuchstiere Auffälligkeiten.

Die Gruppe *PEEK 2 weeks batch II* wies in vier Fällen eine Zunahme des Körpergewichts auf. In einem Fall wurde die Körpermasse vor der Organentnahme nicht erhoben. Es wurde eine durchschnittliche Massezunahme von 21 (SD: ± 15) g festgestellt. Sämtliche Implantate wurden an der eingebrachten Stelle ungelockert vorgefunden. Das umliegende Bindegewebe wies in der makroskopischen Betrachtung keine Zeichen von Schwellung oder Verdickung auf. In drei Fällen wurde eine zarte, gelbliche Verdunkelung im Bereich der Kontaktfläche zwischen Implantat und der Cutis bemerkt. Die Inspektion von innen zeigte eine intakte Dura unter Wiederherstellung der natürlichen Schädelkrümmung.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit behandelt die Etablierung eines Prozesses für die Anwendung 3D-gedruckter Kunststoffimplantate für personalisierte Gesichts- und Schädelersatzmittel. In der prospektiven Interventionsstudie wurde das Vorgehen schrittweise auf dessen Anwendbarkeit und mögliche Auswirkungen untersucht. Die Beobachtungen im Zuge der Untersuchungen deuteten gemeinsam mit der Analyse der erhobenen Daten auf die Eignung des entwickelten Prozesses hin. Im Gegenzug zu der dezentralen Implantatfertigung konnte auf diese Weise ein Verfahren initiiert werden, das künftig ein einheitliches Vorgehen erlaubt und somit Re-Operationen vermeiden könnte.

Im derzeitigen klinischen Gebrauch befinden sich unterschiedliche Materialien zur Defektdeckung. Die Unterscheidung erfolgt einerseits in autologen Knochen und andererseits in alloplastische Materialien [3,4,9]. Letztere werden zusätzlich in vorgefertigte, sowie intraoperativ gestaltete Implantate eingeteilt [9]. In erster Linie wird eine Kranioplastie durch den eigenen Knochen angestrebt [3,4,7-14]. Hierfür sprechen die immunologische Unbedenklichkeit, perfekte Passform und geringe anfallende Kosten [12,15].

Im Falle der dekompressiven Kraniotomie wurde gegenüber elektiven neurochirurgischen Eingriffen eine hohe Komplikationsrate nach Reimplantation des autologen Knochendeckels bemerkt [41-43]. Das Auftreten einer aseptischen Nekrose stellt hierbei die häufigste Komplikation im Langzeit - Follow Up dar. Die Prävalenz bei Erwachsenen wird zwischen 4% [44] und 30% [45] angegeben. Die unterschiedlichen Angaben über die Häufigkeit dieser Komplikation scheint durch eine uneinheitliche Definition des Begriffs der relevanten Resorption, Differenzen in dem Betrachtungszeitraum und durch das Alter der Patientinnen und Patienten bedingt zu sein [45]. Bei Personen unter 20 Jahren wurde eine manifeste Resorption in der Hälfte der Fälle beobachtet [8]. Schwarz et al. identifizierten in einer retrospektiven Studie mit 631 Kranioplastien ein junges Patientenalter, das Vorliegen eines Shunt-abhängigen Hydrocephalus und fragmentierte Implantate als Risikofaktoren für das Auftreten einer

Knochennekrose [46]. In einer Untersuchung von Grant et al. wurde eine positive Korrelation zwischen dem Defektdurchmesser und dem Auftreten einer Knochendeckel-Resorption festgestellt [8]. Als weitere Einflussfaktoren wurden die Art der Aufbewahrung sowie der Zeitpunkt der Kranioplastie präsentiert. Das Einbringen des Knochendeckels in das subcutane Gewebe der Abdominalwand birgt demnach ein geringeres Resorptionsrisiko im Vergleich zur Aufbewahrung mittels Cryokonservierung [47].

Der Zeitpunkt der Defektdeckung nach dekompressiver Kraniotomie wird hingegen kontroversiell diskutiert. Die Gruppe rund um Beauchamp lieferte 2010 den Vorschlag, die Kranioplastie ehestmöglich durchzuführen, sobald sich die Schwellung außerhalb des Schädelgewölbes zurückgebildet hat [48]. Schuss et al. konnten in einer retrospektiven Analyse von 254 Kranioplastien eine Zunahme der perioperativen Komplikationen und eine gesteigerte Resorptionsrate bei einem implantatfreien Intervall ≤ 2 Monate feststellen [44]. Die Beobachtungen von Reid und Kollegen zeigten hingegen keine zeitliche Korrelation zwischen der Reimplantation des Knochendeckels und dem Auftreten von Komplikationen [42]. Ein Vergleich der Ergebnisse ist aufgrund der unterschiedlichen Betrachtungsweisen jedoch nur eingeschränkt möglich.

Die Vielzahl an komplikationsfördernden Faktoren führt zu einer hohen Rate an Re-Operationen nach autologer Kranioplastie. Schwarz et al. berichteten in einer retrospektiven Analyse über eine operative Revisionsrate von 29,6% [46]. Die Gruppe um Stieglitz beobachtete ähnliche Ergebnisse. In 28 von 92 Fällen (30,4%) wurde hierbei der autologe Knochen durch patientenspezifische Allograft-Implantate ersetzt [45].

Die zunehmende Verfügbarkeit synthetischer Alternativen eröffnet daher die Frage nach einer primären Deckung durch alloplastische Implantate. Aufgrund ihrer Untersuchungen liefern Schwarz et al. den Vorschlag, Patientinnen und Patienten unter 30 Jahren, sowie Personen mit einem fragmentierten Knochenstück, primär einer Kranioplastie mit künstlichem Knochenersatz zu unterziehen [46]. In den vorläufigen Ergebnissen einer prospektiven Studie stellten Iaccarino et al. eine Reduktion der Komplikationsrate bei initialer Kranioplastie mit alloplastischen 3D-rekonstruierten Implantaten fest [49]. Die

retrospektiven Beobachtungen ähnlicher Studien unterstreichen dieses Ergebnis [10,43]. Im Gegensatz zum autologen Knochen zeigten die Gruppen mit Implantaten aus PMMA ebenfalls eine geringere Komplikationsrate.

Die Anforderungen an ein ideales synthetisches Knochenersatzmittel umfassen ein inertes Verhalten, höchste Biokompatibilität, ein niedriges Infektionsrisiko, günstige Herstellungskosten, leichte Verfügbarkeit und Anwendbarkeit, Beständigkeit im Langzeitverlauf und die Möglichkeit zur einfachen Entfernung [50]. Derzeit sind Titan PMMA und Hydroxylapatit (HA) die am häufigsten verwendeten Materialien für die Erstellung alloplastischer Implantate [3]. Die Kosten für dezentral gefertigte patientenspezifische Implantate aus Titan belaufen sich auf 2500€ bis 5050€ [3]. Acrylglas bietet gegenüber Titan und HA den Vorteil der intraoperativen Anpassung, wodurch deutlich kostengünstigere Implantate (<500€) erzeugt werden können [3,14,16]. Im Gegensatz zu Titan ermöglicht die Verwendung von Kunststoffen eine uneingeschränkte Bildgebung und adjuvante Strahlenbehandlung [3]. Dieser Vorteil trifft ebenfalls auf die geplanten FDM-Implantate zu.

Das aktuelle Vorgehen intraoperativ gefertigter PMMA-Implantate erfordert hingegen eine händische Modellierung. In der zuvor genannten Studie von Kriegel et al. wurde ein verminderter kosmetischer Aspekt manuell geformter Implantate gegenüber autologen Knochendeckeln festgestellt [10]. Einen weiteren Nachteil dieser Methode birgt die Wärmeentwicklung im Zuge der Polymerisation. Die Gruppe um Golz berichtete über eine längerfristige Exposition und Schädigung der umliegenden Gewebe durch Temperaturen über 50° Celsius [51].

Im Jahr 2014 lieferten Stieglitz et al. einen Ansatz um diese Nachteile zu beseitigen. Sie präsentierten ein Verfahren zur intraoperativen Modellierung patientenspezifischer PMMA-Implantate anhand eines 3D-gedruckten Schädelmodells. Auf diese Weise konnten kostengünstige alloplastische Implantate mit einem guten kosmetischen Outcome generiert werden. Die Komplikationsraten wurden ähnlich jener autologer Implantate oder kommerziell gefertigter Knochenersatzmittel angegeben [16]. Tan et al. entwickelten einen ähnlichen Prozess, ohne ihn jedoch an Patientinnen und Patienten

anzuwenden. Hierbei wurde über eine gelungene Verwendung und einen hohen Grad an Symmetrie berichtet [14]. Die Herstellungszeiten unterschieden sich deutlich in den beiden Studien. In der Untersuchung von Stieglitz et al. wurde ein sogenanntes *Binder-Jetting* Verfahren für die Herstellung der Schablone eingesetzt [16]. Der Druckvorgang benötigte 2,4 Stunden. Die Vorlage musste anschließend über Nacht ruhen. Es wurde berichtet, dass der gesamte Vorgang innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden konnte. Die Gruppe um Tan bediente sich des *Fused Deposition Modeling*-Verfahrens, wodurch die Schablone nach ein- bis zweistündiger Rekonstruktion der Daten in 6 Stunden und 40 Minuten gefertigt werden konnte [14]. Die intraoperative Modellierung des eigentlichen Implantats benötigte in beiden Fällen rund 30 Minuten. Beide Verfahren eignen sich demnach nicht, um ein einziges Vorgehen zu ermöglichen. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen ist aufgrund der unterschiedlichen Größenverhältnisse nicht möglich.

Im vorgestellten Ansatz wird das Implantat ohne Umweg über eine Schablone gedruckt. Im Vergleich zu einem zweistufigen Verfahren wird somit ein kleineres Volumen mit einer geringeren räumlichen Ausdehnung generiert, wodurch eine Reduktion der Arbeitszeit zu erwarten ist. Zurzeit sind keine weiteren Studien mit dem Ziel einer intraoperativen Implantatfertigung durch *Fused Deposition Modeling* bekannt.

Ein ähnlicher Ansatz wurde 2010 von Klammert et al. vorgestellt. Der Gruppe gelang die Herstellung von patientenspezifischen Implantaten aus Calciumhydrogenphosphat dihydrat mittels *3D-Powder Printing* [9]. In der Studie wurden der Herstellungsprozess, die Abbildungsgenauigkeit und die physikalischen Eigenschaften der Brushit-Implantate untersucht. Die Auswirkungen auf einen lebenden Organismus wurden nicht erhoben. Analog zu den eigenen Untersuchungen erfolgte die Implantfertigung in einem einstufigen Verfahren. Das virtuelle Modell des Implantats wurde durch Spiegelung (vgl. Punkt 3.1.2.1) der Gegenseite generiert. In der Publikation finden sich keine Angaben über die Dauer des Gestaltungsvorganges. Der Druckprozess nahm zwischen drei und vier Stunden in Anspruch. Die Überprüfung der Passgenauigkeit brachte im Randbereich teilweise Überlappungen zwischen den Implantaten und dem Schädelpräparat zum Vorschein. Nach anschließender manueller Modifikation der Ränder wurde über eine sehr

zufriedenstellende Einpassung mit Abweichungen $\pm 200 \mu\text{m}$ berichtet. Der *Bending*-Stress Test sowie die Analyse der Thermo-Konduktivität wiesen auf geeignete Materialeigenschaften der Implantate hin. Die Gruppe um Klammert konnte auf diese Weise zeigen, dass eine intraoperative Implantaterstellung durch generative Techniken möglich ist.

Als einschränkende Faktoren seien hierbei die Wahl des Druckverfahrens wie auch die Modellerstellung erwähnt. Die Produktionsweise des *3D-Powder Printers* birgt den Nachteil, mit jedem produzierten Implantat überschüssiges Pulver zu hinterlassen. Somit ist mit einem großen Aufwand zu rechnen, um Verunreinigungen der Folgeimplantate zu vermeiden. Des Weiteren bestehen gesundheitliche sowie hygienische Bedenken durch allfällige Schwebstoffe oder Staubinfektionen. Zurzeit konnten keine Studien ausfindig gemacht werden, die diesen Aspekt adressieren. Eine weitere Limitation des vorgestellten Verfahrens von Klammert et al. stellt die Art der Implantatgestaltung dar. Die Spiegelung der kontralateralen Seite ist nur anwendbar, wenn die Knochenläsion die Mittellinie nicht überschreitet. Ein Vergleich der verwendeten Literatur zeigte, dass 7% [16] bis 21% [42] der Kraniotomien eine bifrontale bzw. bilaterale Ausdehnung besitzen (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 - Häufigkeit bifrontaler/-lateraler Kraniotomien: Vergleich der verwendeten Literatur; *Anzahl der beteiligten Zentren

Autoren	Jahr	n	bifrontal/ - lateral	Zentrum	Zeitraum	Quelle
Cabraja M, Klein M, Lehmann T-N	2009	26	5 (19%)	single center	1983 - 2002	[3]
Gooch MR, Gin GE, Kenning TJ, German JW	2009	62	13 (21%)	single center	2002 - 2008	[42]
Iaccarino C, Viaroli E, Fricia M, Serchi E	2015	88	8 (9%)	multi center (4)*	2008 - 2013	[49]
Kriegel RJ, Schaller C, Clusmann H	2007	65	13 (20%)	single center	1993 - 2004	[10]
Mukherjee S, Thakur B, Haq I, Hettige S, Martin AJ	2014	174	20 (11%)	single center	2005 - 2012	[52]
Rosenthal G, Ng I, Moscovici S, Lee KK, Lay T, Martin C, et al	2014	26	2 (8%)	multi center (3)*	2006 - 2012	[53]
Schuss P, Vatter H, Marquardt G, Imo L, Ulrich CT, Seifert V, et al.	2012	280	37 (13%)	single center	1999 - 2011	[41]
Stieglitz LH, Gerber N, Schmid T, Mordasini P, Fichtner J, Fung C, et al.	2014	28	2 (7%)	single center	2009 - 2012	[16]

In der klinischen Anwendung muss der Knochenersatz für eine beliebige Läsion entwickelt werden. In der Studie von Klammert et al. wurden diese Herausforderungen für die Gestaltung des Implantats nicht berücksichtigt. Die weitere Literaturrecherche lieferte keine Studien, die diesen Ansatz verfolgen. Es konnte keine Beschreibung über das Vorgehen kommerziell gefertigter CAD/CAM- Implantate ausfindig gemacht werden.

Um ein einzeitiges Vorgehen zu ermöglichen muss die Gestaltung des virtuellen Modells intraoperativ durchführbar sein. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt um die indirekte Information des umgebenden Schädels in ein entsprechendes Implantatmodell umzuwandeln. Auf diese Weise bestehen keine Einschränkungen durch die Lokalisation oder eine Abhängigkeit von präoperativen Aufnahmen. Für die Implantatgestaltung wird ausschließlich eine CT-Aufnahme der zu deckenden Läsion benötigt. Dies entspricht demselben Vorgehen, welches im derzeitigen Prozess der dezentralen Implantatfertigung angewandt wird. Somit besteht gegenüber dem Status quo keine zusätzliche Strahlenbelastung für die Patientinnen und Patienten. Die eigenen Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Implantatgestaltung durch Interpretation der indirekten Information aus den CT-Bildern in kurzer Zeit durchführbar ist. Die Betrachtung des Speicherbedarfs verdeutlicht die schrittweise Extraktion der Information von der Defektsituation hin zu den dimensional Daten für das Implantat. Die erfolgreiche Durchführung der eigenen Versuche legt eine Eignung des beschriebenen Herstellungsprozesses nahe. Auf diese Weise können in Zukunft weitere Materialien überprüft werden.

Ein künftiger Routineeinsatz erfordert jedoch eine weitere Prüfung der Implantatfertigung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Skalierung auf humane Dimensionen nicht berücksichtigt. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um mögliche Alterationen durch die Größenzunahme festzustellen. Durch die Steigerung des Verhältnisses zwischen den Implantatabmessungen und der Druckerauflösung ist allerdings mit einer Verbesserung der Passgenauigkeit zu rechnen. Eine weitere Einschränkung ist durch die Lokalisation des Defekts gegeben. In den aktuellen Untersuchungen wurde die Kraniotomie stets an derselben Stelle gesetzt. Auf diese Weise bestand eine geringe Variation des Grundrisses wie auch der Krümmungsverhältnisse.

Die Darstellung komplexer Läsionen könnte in einer Zunahme der Gestaltungsdauer resultieren. Durch eine Steigerung des Durchmessers sowie des Krümmungsausmaßes besteht zudem die Möglichkeit zunehmender Ungenauigkeit durch das manuelle Modellierungsverfahren. Des Weiteren könnten auf diese Weise zusätzliche Stützkonstruktionen erforderlich sein. Dies würde zu einer weiteren Steigerung der Herstellungsdauer führen. Um eine flexible Anwendung zu ermöglichen besteht die Anforderung, den gesamten Prozess während einer Operation durchführen zu können.

Die vorgestellte Methode zur Implantatgestaltung erfordert ein hohes Maß an Training. Durch den Vorgang der manuellen Anpassung wird die Form des Implantats subjektiv beeinflusst. Mögliche Unterschiede in der Interpretation der Information durch verschiedene Anwenderinnen und Anwender wurde in der aktuellen Untersuchung nicht berücksichtigt. In weiterer Folge muss eine Software entwickelt werden, um den Arbeitsschritt – hin zum personalisierten, speziell angepassten Implantat – automatisch abwickeln zu können.

Literaturverzeichnis

1. Mueller S, Hohlweg-Majert B, Buegers R, Steiner T, Reichert TE, Wolff KD, et al. The functional and aesthetic reconstruction of midfacial and orbital defects by combining free flap transfer and craniofacial prosthesis. *Clin Oral Investig.* 2014;413–9.
2. March LM, Cross MJ, Lapsley H, Brnabic AJ, Tribe KL, Bachmeier CJ, et al. Outcomes after hip or knee replacement surgery for osteoarthritis. A prospective cohort study comparing patients' quality of life before and after surgery with age-related population norms. *Med J Aust. AUSTRALIA*; 1999 Sep;171(5):235–8.
3. Cabraja M, Klein M, Lehmann T-N. Long-term results following titanium cranioplasty of large skull defects. *Neurosurg Focus.* 2009;26(6):E10.
4. Artico M, Ferrante L, Pastore FS, Ramundo EO, Cantarelli D, Scopelliti D, et al. Bone autografting of the calvaria and craniofacial skeleton: Historical background, surgical results in a series of 15 patients, and review of the literature. *Surg Neurol.* 2003;60(1):71–9.
5. Dujovny M, Aviles A, Agner C, Fernandez P, Charbel FT. Cranioplasty: Cosmetic or therapeutic? *Surg Neurol* [Internet]. 1997;47(3):238–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090301996000134>
6. Schorl M. Sinking skin flap syndrome (SSFS) - Clinical spectrum and impact on rehabilitation. *Zentralbl Neurochir.* 2009;70(2):68–72.
7. Bergmann C, Lindner M, Zhang W, Koczur K, Kirsten A, Telle R, et al. 3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses. *J Eur Ceram Soc* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;30(12):2563–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955221910002086>
8. Grant G a, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg.* 2004;100(2 Suppl Pediatrics):163–8.

9. Klammert U, Gbureck U, Vorndran E, Rödiger J, Meyer-Marcotty P, Kübler AC. 3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2010;38(8):565–70.
10. Kriegel RJ, Schaller C, Clusmann H. Cranioplasty for large skull defects with PMMA (Polymethylmethacrylate) or tutoplast?? processed autogenic bone grafts. *Zentralbl Neurochir.* 2007;68(4):182–9.
11. Marbacher S, Anderegg L, Erhardt S, Fathi AR, Fandino J, Raabe A, et al. Intraoperative template-molded bone flap reconstruction for patient-specific cranioplasty. *Neurosurg Rev.* 2012;35(4):527–35.
12. Alonso-Rodriguez E, Cebrián JL, Nieto MJ, Del Castillo JL, Hernández-Godoy J, Burgueño M. Polyetheretherketone custom-made implants for craniofacial defects: Report of 14 cases and review of the literature. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2015;43(7):1232–8.
13. Silav G, Bölükbasi FH, Özek E, Töngge M, Mustafa Ö, Elmaci I. A Simple Technique for Bone Storage after Decompressive Craniectomy in Children. *Pediatr Neurosurg* [Internet]. 2015;50(3):161–4. Available from: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000381748>
14. Tan ETW, Ling JM, Dinesh SK. The feasibility of producing patient-specific acrylic cranioplasty implants with a low-cost 3D printer. *J Neurosurg* [Internet]. 2015;1–7. Available from: <http://thejns.org/doi/10.3171/2015.5.JNS15119>
15. Grossman N, Shemesh-Jan HS, Merkin V, Gideon M, Cohen a. Deep-freeze preservation of cranial bones for future cranioplasty: Nine years of experience in Soroka University Medical Center. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(3):243–6.
16. Stieglitz LH, Gerber N, Schmid T, Mordasini P, Fichtner J, Fung C, et al. Intraoperative fabrication of patient-specific moulded implants for skull reconstruction: single-centre experience of 28 cases. *Acta Neurochir (Wien)* [Internet]. 2014;156(4):793–803. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s00701-013-1977-5>

17. Durham SR, McComb JG, Levy ML. Correction of Large (>25 cm²) Cranial Defects with “Reinforced” Hydroxyapatite Cement: Technique and Complications. *Neurosurgery* [Internet]. 2003;52(4):842–5. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006123-200304000-00015>
18. Schubert C, van Langeveld MC, Donoso L a. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2014;98(2):159–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288392>
19. Kim YS, Shin YS, Park DY, Choi JW, Park JK, Kim DH, et al. The Application of Three-Dimensional Printing in Animal Model of Augmentation Rhinoplasty. *Ann Biomed Eng* [Internet]. 2015;(1). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10439-015-1261-3>
20. Naftulin JS, Kimchi EY, Cash SS. Streamlined, Inexpensive 3D Printing of the Brain and Skull. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(8):e0136198. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0136198>
21. Gu Q, Hao J, Lu Y, Wang L, Wallace GG, Zhou Q. Three-dimensional bio-printing. *Sci China Life Sci* [Internet]. 2015;58(5):411–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11427-015-4850-3>
22. Jonathan G, Karim A. 3D printing in pharmaceuticals: A new tool for designing customized drug delivery systems. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;499(1-2):376–94. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517315304622>
23. Ventola CL. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *P T* [Internet]. 2014;39(10):704–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4189697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

24. Berman B. 3-D printing: The new industrial revolution. *Bus Horiz* [Internet]. "Kelley School of Business, Indiana University"; 2012;55(2):155–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bushor.2011.11.003>
25. Cali J, Calian D a., Amati C, Kleinberger R, Steed A, Kautz J, et al. 3D-printing of non-assembly, articulated models. *ACM Trans Graph* [Internet]. 2012;31(6):1. Available from: <http://dl.acm.org/citation.cfm?doid=2366145.2366149>
26. Campbell T, Williams C, Ivanova O, Garret B. Could 3D Printing Change the World? Technologies, Potential, and Implications of Additive Manufacturing. *Technol Potential, Implic Addit Manuf*. 2012;16.
27. Kim GB, Lee S, Kim H, Yang DH, Kim Y-H, Kyung YS, et al. Three-Dimensional Printing: Basic Principles and Applications in Medicine and Radiology. *Korean J Radiol* [Internet]. 2016;17(2):182. Available from: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3348/kjr.2016.17.2.182>
28. Espalin D, Arcaute K, Rodriguez D, Medina F, Posner M. Fused Deposition Modeling of Polymethylmethacrylate for Use in Patient- Specific Reconstructive Surgery. *Design*. :569–83.
29. Nuyken O, Samarian H, Wurdack I. Polymere in der Medizintechnik - Chemgapedia [Internet]. [cited 2016 May 15]. Available from: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/9/mac/neu/medizin/medizin.vlu/Page/vsc/de/ch/9/mac/neu/medizin/anford.vscml.html>
30. Johansson P, Jimbo R, Naito Y, Kjellin P, Currie F, Wennberg A. Polyether ether ketone implants achieve increased bone fusion when coated with nano-sized hydroxyapatite: a histomorphometric study in rabbit bone. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1435–42.
31. Kurtz SM, Devine JN. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*. 2007;28(32):4845–69.
32. Mazonakis M, Damilakis J. Computed tomography: What and how does it measure?

Eur J Radiol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2016;2–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0720048X16300754>

33. Rengier F, Mehndiratta A, Von Tengg-Kobligk H, Zechmann CM, Unterhinninghofen R, Kauczor HU, et al. 3D printing based on imaging data: Review of medical applications. *Int J Comput Assist Radiol Surg*. 2010;5(4):335–41.
34. Gittard SD, Narayan RJ, Lusk J, Morel P, Stockmans F, Ramsey M, et al. Rapid prototyping of scaphoid and lunate bones. *Biotechnol J*. 2009;4(1):129–34.
35. Hughes PC, Tanner JM. A longitudinal study of the growth of the black-hooded rat: methods of measurement and rates of growth for skull, limbs, pelvis, nose-rump and tail lengths. *J Anat*. 1970;106(Pt 2):349–70.
36. Blasiak T, Czubak W, Ignaciak A, Lewandowski MH. A new approach to detection of the bregma point on the rat skull. *J Neurosci Methods*. 2010;185(2):199–203.
37. Fedorov A, Beichel R, Kalphaty-Cramer J, Finet J, Fillion-Robbin J-C, Pujol S, et al. 3D Slicer as an Image Computing Platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging*. 2012;30(9):1323–41.
38. Meijering EHW, Niessen WJ, Pluim JPW, Viergever MA. Quantitative Comparison of Sinc-Approximating Kernels for Medical Image Interpolation. *Computer (Long Beach Calif)*. 1999;1679:210–7.
39. Society V, Tier SG, Tvt T, Nicklas W. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. Biebrach a.d. Riss; 2009.
40. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp [Internet]*. 2012;(65):e3564. Available from: <http://www.jove.com/video/3564/whole-animal-perfusion-fixation-for-rodents>
41. Schuss P, Vatter H, Marquardt G, Imöhl L, Ulrich CT, Seifert V, et al. Cranioplasty after Decompressive Craniectomy: The Effect of Timing on Postoperative Complications. *J Neurotrauma*. 2012;29(6):1090–5.

42. Gooch MR, Gin GE, Kenning TJ, German JW. Complications of cranioplasty following decompressive craniectomy: analysis of 62 cases. *Neurosurg Focus*. 2009;26(6):E9.
43. Bobinski L, Koskinen LOD, Lindvall P. Complications following cranioplasty using autologous bone or polymethylmethacrylate - Retrospective experience from a single center. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;115(9):1788–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.04.013>
44. Schuss P, Vatter H, Oszvald Á, Marquardt G, Imöhl L, Seifert V, et al. Bone flap resorption: Risk factors for the development of a long-term complication following cranioplasty after decompressive craniectomy. *J Neurotrauma*. 2012;95(30):120912140809000.
45. Stieglitz LH, Fung C, Murek M, Fichtner J, Raabe A, Beck J. What happens to the bone flap? Long-term outcome after reimplantation of cryoconserved bone flaps in a consecutive series of 92 patients. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157(2):275–80.
46. Care I. Cranioplasty after decompressive craniectomy: is there a rationale for an initial artificial bone-substitute implant? A single-center experience after 631 procedures. *J Neurosurg* [Internet]. 2015;124(March):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26406796>
47. Cheng CH, Lee HC, Chen CC, Cho DY, Lin HL. Cryopreservation versus subcutaneous preservation of autologous bone flaps for Cranioplasty: Comparison of the surgical site infection and bone resorption rates. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;124:85–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2014.06.029>
48. Beauchamp KM, Kashuk J, Moore EE, Bolles G, Rabb C, Seinfeld J, et al. Cranioplasty after postinjury decompressive craniectomy: is timing of the essence? *J Trauma*. 2010;69(2):270–4.
49. Iaccarino C, Viaroli E, Fricia M, Serchi E, Poli T, Servadei F. Preliminary Results of a Prospective Study on Methods of Cranial Reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg*

[Internet]. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons; 2015;73(12):2375–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2015.07.008>

50. Marchac D, Greensmith A. Long-term experience with methylmethacrylate cranioplasty in craniofacial surgery. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2008;61(7):744–52.
51. Golz T, Graham CR, Busch LC, Wulf J, Winder RJ. Temperature elevation during simulated polymethylmethacrylate (PMMA) cranioplasty in a cadaver model. *J Clin Neurosci* [Internet]. 2010 May [cited 2016 Mar 16];17(5):617–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189395>
52. Mukherjee S, Thakur B, Haq I, Hettige S, Martin AJ. Complications of titanium cranioplasty — a retrospective analysis of 174 patients. *Acta Neurochir (Wien).* 2014;156:989–98.
53. Rosenthal G, Ng I, Moscovici S, Lee KK, Lay T, Martin C, et al. Polyetheretherketone implants for the repair of large cranial defects: A 3-center experience. *Neurosurgery.* 2014;75(5):523–8.