

it may lead to complete absence of the foreign material and long-term foreign body-associated complications. The degree of implant degradation, which was independent of the infection, differed between the polymers (Chapters IV, VI, and VII). Morphometry showed that implants made of HPOE/PBT copolymer and Estane had a moderate degree of breakdown (average values of breakdown of 46 and 60%, respectively, at the end of one year), and that an average 93% of polypropylene oxide disappeared within one year. Differences in breakdown behaviors were also evident from the electron-microscopical picture of the phagocyte/polymer interactions, which indicated absence of Silastic degradation (Chapter VI). Because the total volume of macrophages and foreign-body giant cells, which is considered to be a measure of the foreign-body reaction caused by porous implants, was largest for Estane and polypropylene oxide implants and smallest for implants made of HPOE/PBT copolymer, this last material seems to be the least foreign to the organism (Chapters IV and VI). Since complete covering and incorporation by tissue always preceded implant degradation, it may be concluded that neither the scaffolding of tissue by an implant nor the fixation of an implant by tissue will be endangered by implant degradation. Only degradation of polypropylene oxide led to the release of toxic substances (Chapters IV and V). Breaking down of the three degradable polymers led to the presence of iron, silicon, aluminum, and titanium in the phagocyte cytoplasm after six months, but there were no signs of any toxic or systemic reactions associated with the accumulation of these polymer-derived trace elements (Chapter IV).

It can be concluded from the present findings that due to its toxic behavior the polypropylene oxide under study is not a suitable implant material and that both the absence of degradation and the lack of firm fixation make the dense Silastic implants unsuitable as an alloplastic tympanic membrane. Although both Estane and HPOE/PBT copolymer not only allowed the adhesion and proliferation of epithelial cells *in vitro*, but also degraded without notable toxic responses and were fixed by tissue *in vivo*, only HPOE/PBT copolymer seems promising as alloplastic tympanic membrane. The milder foreign-body reaction provoked by this material, and especially the probable binding with bone make HPOE/PBT copolymer suitable for clinical application. Chemical bonding with bone, which is exceptional for a polymer, insures not only optimal fixation of an alloplastic tympanic membrane but also makes HPOE/PBT copolymer applicable in biomedical situations where a bone-binding elastomer is needed.

SAMENVATTING

Chronische infecties van het middenoor kunnen leiden tot een aantasting van de gehele gehoorbeenketen die omwille van het genezingsproces eventueel moet worden verwijderd. Als gevolg van problemen zoals het loslaten of het afstoten is de gehoorsverbetering door middel van protheses die de gehele gehoorbeenketen vervangen, onbevredigend. Daarom is voor patiënten zonder gehoorbeenketen een totaal kunstmiddenoor ontwikkeld. Hierin is de hydroxyapatiet gehoorbeenketen door middel van een kunsttrommelvlies, dat gemaakt is van een elastisch polymeer, bevestigd aan een poreus hydroxyapatiet ophangstelsel. Dit elastomeer kan echter ook worden gebruikt voor het sluiten van trommelvliesperforaties. In het onderhavige onderzoek staat de biocompatibiliteit (hoe reageert het lichaam op de aanwezigheid van het implantaatmateriaal - biomateriaal - en omgekeerd) van diverse kandidaatmaterialen voor kunsttrommelvlies centraal. Van zes biomaterialen is met celkweektechnieken (*in vitro*) en van vier biomaterialen is ook met implantatiestudies (in zowel een niet-geïnfecteerde alsook in een geïnfecteerde omgeving) onderzocht of zij geschikt zijn als substraat voor weefsel. Voorts is onderzocht of deze materialen worden gefixeerd door weefsel en hoe hun degradatiegedrag is. De bestudeerde biomaterialen zijn Silastic^R, Estane^R 5714 F1 polyetherurethaan, polypropyleenoxide, poly(ethyleenoxide hydantoïne) en poly(tetramethyleen tereftalaat) gesegmenteerd polyether polyester copolymeer (HPOE/PBT-copolymeer), Dow Corning^R MDX-4-4210-Clean Grade Elastomer en Pellethane^R 80-A polyesterurethaan. Proefdierstudies (*in vivo*) zijn alleen uitgevoerd met implantaten gemaakt van de eerste vier materialen.

Verschillende celkweekexperimenten (gebaseerd op celgroei, celmorfologie en kunstmatige veroudering van de polymeren) uitgevoerd met niet-poreuze films gemaakt van de diverse polymeren, toonden aan dat polypropyleenoxide de hechting en groei van ratte middenoor epitheelcellen niet toestond, mogelijkkerwijs als gevolg van het vrijkomen van toxische stoffen (Hoofdstuk II). Elastomer bleek ook een minder goed substraat, terwijl het gedrag van epitheel gekweekt op Silastic, Estane, Pellethane, en HPOE/PBT-copolymeer normaal was. Cellen gekweekt in het bijzijn van kunstmatig-verouderd Silastic vertoonden insluitsels met silicium. Eventuele intracellulaire ophoping van silicium in het organisme na afbraak van Silastic maakt dit materiaal ongeschikt voor biomedische toepassing.

Alle implantaties van de polymeren die zijn bestudeerd in het middenoor van de rat resulteerden in een wond- en een vreemdlichaamreactie, onafhankelijk van de implantatieplaats: in het trommelvlies, onder het slijmvlies of tegen het spierweefsel aan dat het middenoor omgeeft. De heftigheid van de vreemdlichaamreactie, die gekenmerkt werd door de aanwezigheid van fagocyten-

it may lead to complete absence of the foreign material and long-term foreign body-associated complications. The degree of implant degradation, which was independent of the infection, differed between the polymers (Chapters IV, VI, and VII). Morphometry showed that implants made of HPOE/PBT copolymer and Estane had a moderate degree of breakdown (average values of breakdown of 46 and 60%, respectively, at the end of one year), and that an average 93% of polypropylene oxide disappeared within one year. Differences in breakdown behaviors were also evident from the electron-microscopical picture of the phagocyte/polymer interactions, which indicated absence of Silastic degradation (Chapter VI). Because the total volume of macrophages and foreign-body giant cells, which is considered to be a measure of the foreign-body reaction caused by porous implants, was largest for Estane and polypropylene oxide implants and smallest for implants made of HPOE/PBT copolymer, this last material seems to be the least foreign to the organism (Chapters IV and VI). Since complete covering and incorporation by tissue always preceded implant degradation, it may be concluded that neither the scaffolding of tissue by an implant nor the fixation of an implant by tissue will be endangered by implant degradation. Only degradation of polypropylene oxide led to the release of toxic substances (Chapters IV and V). Breaking down of the three degradable polymers led to the presence of iron, silicon, aluminum, and titanium in the phagocyte cytoplasm after six months, but there were no signs of any toxic or systemic reactions associated with the accumulation of these polymer-derived trace elements (Chapter IV).

It can be concluded from the present findings that due to its toxic behavior the polypropylene oxide under study is not a suitable implant material and that both the absence of degradation and the lack of firm fixation make the dense Silastic implants unsuitable as an alloplastic tympanic membrane. Although both Estane and HPOE/PBT copolymer not only allowed the adhesion and proliferation of epithelial cells *in vitro*, but also degraded without notable toxic responses and were fixed by tissue *in vivo*, only HPOE/PBT copolymer seems promising as alloplastic tympanic membrane. The milder foreign-body reaction provoked by this material, and especially the probable binding with bone make HPOE/PBT copolymer suitable for clinical application. Chemical bonding with bone, which is exceptional for a polymer, insures not only optimal fixation of an alloplastic tympanic membrane but also makes HPOE/PBT copolymer applicable in biomedical situations where a bone-binding elastomer is needed.

SAMENVATTING

Chronische infecties van het middenoor kunnen leiden tot een aantasting van de gehele gehoorbeenketen die omwille van het genezingsproces eventueel moet worden verwijderd. Als gevolg van problemen zoals het loslaten of het afstoten is de gehoorsverbetering door middel van protheses die de gehele gehoorbeenketen vervangen, onbevredigend. Daarom is voor patiënten zonder gehoorbeenketen een totaal kunstmiddenoor ontwikkeld. Hierin is de hydroxyapatiet gehoorbeenketen door middel van een kunsttrommelvlies, dat gemaakt is van een elastisch polymeer, bevestigd aan een poreus hydroxyapatiet ophangstelsel. Dit elastomeer kan echter ook worden gebruikt voor het sluiten van trommelvliesperforaties. In het onderhavige onderzoek staat de biocompatibiliteit (hoe reageert het lichaam op de aanwezigheid van het implantaatmateriaal - biomateriaal - en omgekeerd) van diverse kandidaatmaterialen voor kunsttrommelvlies centraal. Van zes biomaterialen is met celkweektechnieken (*in vitro*) en van vier biomaterialen is ook met implantatiestudies (in zowel een niet-geïnfecteerde alsook in een geïnfecteerde omgeving) onderzocht of zij geschikt zijn als substraat voor weefsel. Voorts is onderzocht of deze materialen worden gefixeerd door weefsel en hoe hun degradatiegedrag is. De bestudeerde biomaterialen zijn Silastic^R, Estane^R 5714 F1 polyetherurethaan, polypropyleenoxide, poly(ethyleenoxide hydantoïne) en poly(tetramethyleen tereftalaat) gesegmenteerd polyether polyester copolymeer (HPOE/PBT-copolymeer), Dow Corning^R MDX-4-4210-Clean Grade Elastomer en Pellethane^R 80-A polyesterurethaan. Proefdierstudies (*in vivo*) zijn alleen uitgevoerd met implantaten gemaakt van de eerste vier materialen.

Verschillende celkweekexperimenten (gebaseerd op celgroei, celmorfologie en kunstmatige veroudering van de polymeren) uitgevoerd met niet-poreuze films gemaakt van de diverse polymeren, toonden aan dat polypropyleenoxide de hechting en groei van ratte middenoor epitheelcellen niet toestond, mogelijkkerwijs als gevolg van het vrijkomen van toxische stoffen (Hoofdstuk II). Elastomer bleek ook een minder goed substraat, terwijl het gedrag van epitheel gekweekt op Silastic, Estane, Pellethane, en HPOE/PBT-copolymeer normaal was. Cellen gekweekt in het bijzijn van kunstmatig-verouderd Silastic vertoonden insluitsels met silicium. Eventuele intracellulaire ophoping van silicium in het organisme na afbraak van Silastic maakt dit materiaal ongeschikt voor biomedische toepassing.

Alle implantaties van de polymeren die zijn bestudeerd in het middenoor van de rat resulteerden in een wond- en een vreemdlichaamreactie, onafhankelijk van de implantatieplaats: in het trommelvlies, onder het slijmvlies of tegen het spierweefsel aan dat het middenoor omgeeft. De heftigheid van de vreemdlichaamreactie, die gekenmerkt werd door de aanwezigheid van fagocyten-

zoals macrofagen en vreemdlichaamreuscellen - en een kapsel van bindweefsel, bleek afhankelijk van de implantatieplaats (Hoofdstuk V). Na implantatie in het trommelvlies werden poreuze implantaten van Estane en polypropyleenoxide sneller bedekt door weefsel dan implantaten van HPOE/PBT-copolymeer, die maar aan één zijde poreus waren. Niet-poreuze Silastic implantaten werden in het geheel niet geïncorporeerd in het trommelvlies. Gezien de reacties van epitheelcellen in kweek op deze materialen mag worden geconcludeerd dat na implantatie de overgroei door weefsel in belangrijke mate bepaald wordt door de structuur van het implantaat en in mindere mate door de chemische eigenschappen van het polymeer, waaruit het implantaat bestaat.

Trommelvliezen met poreuze implantaten waren na zes maanden bedekt met een normale epidermis van verhoornend epitheel en met een normale epitheel laag bestaande uit vlak polygonaal- en trilhaarepitheel (Hoofdstuk VIII). Alle implantaten geplaatst onder het middenoorslijmvlies waren bedekt met een slijmvlies, dat aan de bovenzijde vlak polygonaal epitheel, trilhaarepitheel en slijmbekercellen bevatte. Gezien de normale morfologie en samenstelling van het epitheel dat alle materialen bedekte, dus ook polypropyleenoxide, mag worden gesteld dat, in tegenstelling tot het gedrag van epitheel *in vitro*, epitheelreacties *in vivo* onvoldoende informatie geven omtrent de geschiktheid van een polymeer als biomateriaal. De epitheelreacties tijdens de *Staphylococcus aureus*-geïnduceerde infectie waren vergelijkbaar met de reacties in het normale ratte middenoor gedurende deze infectie (Hoofdstuk III). Geconcludeerd mag worden dat de normale epitheelrespons op de *S.aureus*-infectie niet werd beïnvloed door de aanwezigheid van de geteste materialen. Na infectie echter, bevatten de trommelvliezen met HPOE/PBT-copolymeer relatief veel ontstekingscellen en bacterieresten (Hoofdstukken VII en VIII). Dit duidt op een heftiger reactie, hetgeen een complicatie lijkt te zijn van de tragere overgroei van HPOE/PBT-copolymeer implantaten door weefsel.

Afhankelijk van het materiaal werd mechanische en chemische implantaatfixatie waargenomen (Hoofdstukken IV en VI). Voor wat betreft de mechanische fixatie kan worden geconcludeerd dat het altijd aanwezige kapsel van bindweefsel rond de Silastic implantaten resulteerde in een slechte integratie in het organisme. De samenstelling van het weefsel in de poriën van polypropyleenoxide - een toenemende hoeveelheid fagocyten - duidde op ook een inferieure mechanische fixatie van dit polymeer. De aanwezigheid van fibreusweefsel in met name de trommelvliesimplantaten en de ingroei van bot (tussen drie en zes maanden) in de implantaten onder het middenoorslijmvlies wezen op een betere mechanische fixatie van Estane. HPOE/PBT-copolymeer implantaten bevatten het meeste

bindweefsel en bot. Bot, waarvan de ingroei al na een week werd waargenomen, werd allereerst afgezet aan het HPOE/PBT-copolymeer implantaatoppervlak en groeide vervolgens naar het centrum van de poriën toe (Hoofdstuk IV). Verder was de contactzone van bot met HPOE/PBT-copolymeer gekarakteriseerd door een elektronendichte laag (Hoofdstukken IV en VI). De bij het HPOE/PBT-copolymeer waargenomen groeirichting van bot en de elektronendichte grenslaag suggereren een bioactiviteit van HPOE/PBT-copolymeer en een chemische binding tussen bot en het copolymeer implantaat. Geconcludeerd kan worden dat implantaten van HPOE/PBT-copolymeer het beste werden gefixeerd: zowel mechanisch als chemisch. De opgewekte infectie had geen invloed op de implantaatfixatie door weefsel (Hoofdstuk VIII).

Het kunsttrommelvlies moet bij voorkeur degraderen omdat dit leidt tot de afwezigheid van het lichaamsvreemde materiaal zodat eventuele lange-termijn complicaties samenhangend met het biomateriaal niet mogelijk zijn. Door gebruik te maken van morfometrie kon worden aangetoond dat de mate van degradatie karakteristiek was voor ieder polymeer (Hoofdstukken IV en V) en niet werd beïnvloed door de infectie (Hoofdstuk VII). HPOE/PBT-copolymeer en Estane gedroegen zich als matig-snel afbreekbare polymeren (respectievelijk 46 en 60% afbraak gemiddeld in een jaar) terwijl polypropyleenoxide relatief snel afbreekbaar bleek (93%/jaar). Verschillen in degradatiegedrag bleken ook uit de interacties van deze polymeren met mono- en multinucleaire fagocyten zoals werd waargenomen met de elektronenmicroscopie (Hoofdstuk VI). Hiermee is ook vastgesteld dat Silastic niet zichtbaar degradeerde. Het volume ingenomen door de populatie fagocyten rond een poreus implantaat wordt beschouwd als een maat voor de sterkte van de vreemdlichaamreactie. Dit volume bleek gemiddeld het grootst bij Estane en polypropyleenoxide en het kleinst bij copolymeer implantaten, zodat mag worden geconcludeerd dat het organisme de implantaten van HPOE/PBT-copolymeer als de minst lichaamsvreemde beschouwde (Hoofdstuk IV). Omdat volledige overgroei en incorporatie van de poreuze implantaten door weefsel vooraf gingen aan de polymeerafbraak lijkt degradatie de substraatfunctie en de fixatie van deze materialen niet in gevaar te brengen.

Alleen de afbraak van polypropyleenoxide leidde tot het vrijkomen van toxische stoffen (Hoofdstukken IV en V). Degradatie van alle poreuze implantaten resulteerde vanaf zes maanden in een ophoping van ijzer, silicium, aluminium en titanium in fagocyten, zoals bleek uit waarnemingen uitgevoerd met röntgenmicroanalyse. Er zijn geen aanwijzingen dat de opslag van dergelijke verontreinigingen - vermoedelijk afkomstig uit de polymeren - zal resulteren in effecten van toxische of systemische aard (Hoofdstuk IV).

Op grond van de resultaten van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift kan worden geconcludeerd dat gezien de toxische eigenschappen het geteste polypropyleenoxide niet geschikt is als biomateriaal. Voorts blijkt niet-poreus Silastic ongeschikt als kunsttrommelvlies omdat het niet voldoende wordt gefixeerd in het lichaam en omdat het niet degradeert. Ofschoon zowel Estane als HPOE/PBT-copolymeer celhechting en celgroei toestonden, degradeerden zonder een zichtbare toxische respons te induceren en bovendien werden gefixeerd door weefsel, is alleen HPOE/PBT-copolymeer veelbelovend als kunsttrommelvlies. Behalve de mildere vreemdlichaamreactie betekent vooral de mogelijke binding met bot een motief om implantaten van dit polymeer klinisch experimenteel te gaan testen. Een chemische binding met bot, hetgeen uniek zou zijn voor een polymeer, biedt niet alleen de mogelijkheid om een kunsttrommelvlies te maken dat optimaal kan worden gefixeerd in het middenoor, maar het maakt HPOE/PBT-copolymeer ook geschikt voor biomedische toepassingen in het geval een elastomeer nodig is dat met bot bindt.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 9 december 1957 geboren te Ede. De middelbare schoolopleiding atheneum B werd in 1970 aangevangen aan het Christelijk Lyceum te Almelo en in 1977 afgerond aan het Marnix College te Ede. Na een studiejaar geofysica werd in 1978 begonnen met de studie biologie aan de Rijksuniversiteit van Utrecht. Het kandidaatsexamen B1 werd in 1981 afgelegd. Voltuiging van de opleiding vond plaats in 1984 in de richtingen Biologische Procestechnologie, Elektronenmicroscopische Structuuranalyse en Celbiologie. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is op 16 juli 1984 aangevangen bij de Afdeling Keel-, Neus-, en Oorheilkunde van het Academisch Ziekenhuis Leiden (onder leiding van Prof. dr. J.J. Grote en Dr. C.A. van Blitterswijk) en bij het Laboratorium voor Elektronenmicroscopie van de Rijksuniversiteit Leiden (onder leiding van Prof. dr. W.Th. Daems). Vanaf 1 augustus 1988 is de auteur werkzaam bij Holland Composite Implants b.v. en de Rijksuniversiteit Leiden.

NAWOORD

Naast de personen die genoemd zijn in de acknowledgements behorende bij de diverse hoofdstukken wil ik ook graag noemen Prof. dr. A. Bantjes en Prof. dr. J. Feijen (Technische Universiteit Twente), Dr. C.M.F. Vrouwenraets (Enka bv, Arnhem), Dr. J.M. Schakenraad (Rijksuniversiteit Groningen), Dhr. H. Choufoer, Prof. dr. G.J. Mulder en Dhr. J.M. van't Noordende (Rijksuniversiteit Leiden), Dhr. H. Dudart, Dhr. V. Gerritsma, Mw. J. Kempenaar, Dr. M. Ponc en Mw. W.M. van Veen (Academisch Ziekenhuis Leiden), Dhr. R. Kamerling (Kamerling Onnes Laboratorium), Mw. D. Versleijen (Radboudziekenhuis Nijmegen) en Mw. I. Seeger-Wolf.