

and poly-DL-lactide has some bone bonding potential and is most likely degradable, without leaving crystalline remnants in the tissue. In this study, the initial amount of 50% w/w hydroxyapatite present in the composite was insufficient to establish bone bonding directly (within 6 weeks) after implantation. Thus, further research on its bone bonding, mechanical and application properties is justified, but also necessary, prior to clinical use. Care should be taken in the use of crystalline high molecular weight polylactides, with or without hydroxyapatite, until their complete degradation has been demonstrated.

SAMENVATTING

Hydroxyapatiet/polylactide composieten zijn, met behulp van *in vitro* en *in vivo* testen, onderzocht op hun biologische geschiktheid om binnen de reconstructieve chirurgie van het hoofd/hals gebied gebruikt te kunnen worden. Van hydroxyapatiet is bekend dat het een goede biocompatibiliteit bezit en aan bot bindt. De biocompatibiliteit van polylactide is nog onderhevig aan twijfel omdat de resultaten van verschillende studies niet overeenkomen, alhoewel polylactide reeds succesvol wordt toegepast binnen verschillende medische disciplines.

Er zijn vier polylactiden met verschillende degradatie snelheden, poly-L-lactiden 100, 240, 500 kDa en een poly-DL-lactide 400 kDa, *in vitro* getest met behulp van vijf verschillende celtypen. De proliferatie van de cellen is onderzocht door deze op polylactide films te kweken en in medium dat de degradatie produkten bevatte van kunstmatig verouderde films. Twee van de vijf celtypen zijn ook in medium gekweekt dat verschillende concentraties van L- of D-monomer bevatte. Deze monomeren stelden de uiteindelijke degradatie produkten van polylactiden voor. De resultaten beschreven in de hoofdstukken II en III, toonden aan dat de morfologie van de cellen niet was aangetast door het kweken op de polylactide films; er bleven echter wel bepaalde stukken van de films onbedekt. De morfologie werd ook niet aangetast door de cellen te kweken met media die de degradatie produkten van de kunstmatig verouderde polylactiden bevatten. De proliferatie van de cellen vertoonde soms een afwijking ten opzichte van de controle, maar hierin kon geen consistente lijn worden ontdekt, waardoor een bepaald polylactide mindere biocompatibele eigenschappen zou bezitten. Het experiment waarin de cellen gekweekt werden met verschillende concentraties L- en D-monomer toonde aan dat hoge (1%) concentraties een duidelijke afname in de proliferatie veroorzaakten en een verandering in de morfologie. De fibroblasten waren veel groter en de neusseptumepitheelcellen vertoonden een toename in de terminale differentiatie voor de D-monomer, zelfs wanneer de osmolariteit van het betreffende medium was bijgesteld. Diepgaander vervolgonderzoek was echter nodig om hierover definitieve conclusies te trekken. De resultaten van dit vervolg onderzoek staan beschreven in hoofdstuk IV.

Zowel de L- als de D- monomer zijn hiertoe in concentraties van 0.01% en 0.5% aan kweek medium toegevoegd. De 0.5% monomeren zijn ook toegevoegd aan een gemodificeerd medium met initieel een lagere osmolariteit. Evaluatie van de proliferatie,

morfologie en cellulaire activiteit van de fibroblasten toonde aan dat ze niet werden aangetast door 0.01% melkzuur monomeer, maar dat toevoeging van 0.5% monomeer leidde tot een reductie in de metabolische activiteit van ongeveer 40% vergeleken met de controle, ongeacht de osmolariteit van het medium. De proliferatie en morfologie werden alleen aangetast wanneer 0.5% monomeer was toegevoegd aan normaal medium, waarvan de osmolariteit dus verhoogd was. De toevoeging van sucrose aan normaal medium (wat eveneens tot een hogere osmolariteit leidde) zorgde voor een toegenomen proliferatie en zure fosfatase activiteit alsmede een veranderde morfologie.

De waarde van deze bevindingen voor een *in vivo* situatie kan helaas niet gegeven worden, mede omdat zulke concentraties zullen waarschijnlijk niet *in vivo* voorkomen. Op basis van deze studie kan wel de conclusie worden getrokken dat zowel de osmolariteit als de aard en concentratie van het toegevoegde materiaal een invloed kunnen uitoefenen op de proliferatie, morfologie en cellulaire activiteit. De osmolariteit van testmedia moet dus worden gestandaardiseerd voor het gebruik in *in vitro* biocompatibiliteitsassays.

Alle *in vitro* experimenten hebben de goede biocompatibiliteit van de onderzochte polylactiden aangetoond. *In vitro* experimenten missen echter de complexiteit van *in vivo* reacties. Daarom is de ontstekingsreactie van de polylactiden ook bepaald door polylactidepartikels in de buikholte van proefdieren te injecteren zoals beschreven in hoofdstuk V.

Vier typen polylactidepartikels, poly-L-lactide 100, 250, 550 kDa en een poly-DL-lactide 400 kDa zijn in de buikholte van muizen geïnjecteerd. De inflammatoire respons bestond uit een toename van het aantal cellen (voornamelijk neutrofiële granulocyten) tot 48 uur na injectie waarna het celtaantal afnam tot onder het niveau van de controle (fosfaat gebufferd fysiologisch zout). Alle vier de polylactidepartikeltjes gaven aanleiding tot aggregaatvorming samen met ontstekingscellen. Deze aggregaten bleven gedurende de hele onderzoek periode van 6 maanden aanwezig. Kwantitatieve resultaten hebben aangetoond dat standaardisatie van de partikelvorm en -grootte essentieel is om betrouwbare metingen aan bv. degradatie te kunnen uitvoeren. Op basis van de resultaten uit deze studie en andere experimenten waarbij calcium fosfaten en asbest werden geïnjecteerd in de buikholte, kan de conclusie worden getrokken dat de inflammatoire respons zoals deze is waargenomen in de buikholte, gerelateerd is aan het type materiaal (polylactide geeft een veel (5-voudig) hogere reactie dan calcium fosfaten)

en mogelijk ook aan vorm en grootte van de individuele partikels.

Zowel de *in vitro* experimenten als het *in vivo* experiment hebben aangetoond dat de polylactiden beschouwd kunnen worden als kandidaatcomponenten van het hydroxyapatiet/polylactide composiet. Alvorens deze *in vivo* te testen is de botvorming *in vitro* onderzocht (hoofdstuk VI). Hiertoe zijn poly-L-lactide substraten gecoat met verschillende hoeveelheden hydroxyapatiet (0%, 15%, 36%, en 100%) m.b.v. de plasma spray techniek. Hierop zijn beenmergcellen van een rat gedurende een, twee, vier, en acht weken gekweekt, waarna de cellulaire respons en de vorming van een extracellulaire matrix werden bestudeerd op zowel licht- als elektronen microscopisch niveau. Het ontstaan van meerdere cellagen werd waargenomen op de 0%, 36% en 100% coatings, maar niet op de 15% coating. Bovendien was bij de 15% coating een matige vorming van een extracellulaire matrix te zien in tegenstelling tot de andere coatings waar de extracellulaire matrix rijkelijk gevormd was. Met behulp van scanning- en transmissie elektronen microscopie kon een mineralisatie van de extracellulaire matrix na respectievelijk twee en vier weken worden aangetoond op de 100% en 36% coatings en na acht weken op de 15% coating. Er werd geen mineralisatie waargenomen op het ongecoate poly-L-lactide. Aan de interface van hydroxyapatiet en de gemineraliseerde extracellulaire matrix werden vaak een of meerdere elektronen dichte lagen waargenomen, zoals deze ook *in vivo* kunnen worden waargenomen. De resultaten van deze studie tonen aan dat, in het gebruikte model, hydroxyapatiet nodig is om een gemineraliseerde matrix op poly-L-lactide te bewerkstelligen.

In hoofdstuk VII is vervolgens de weefselreactie op vier verschillende hydroxyapatiet/polylactide (50% w/w) composieten na implantatie beschreven. De gebruikte polylactiden waren poly-L-lactiden van 100, 250 en 500 kDa en een poly-DL-lactide van 400 kDa. De hydroxyapatietpartikeltjes zijn vlak voor het polymerisatieproces toegevoegd waardoor uiteindelijk composieten zijn verkregen met afwisselend gebieden van hydroxyapatiet en polylactide. Deze composieten zijn geïmplanteerd in de tibias van ratten en onderzocht na een, twee, vier, twaalf, vierentwintig en vijftig weken. Histologische evaluatie van deze tibias toonde aan dat het botcontact van de composieten met poly-L-lactide verschilde van dat van composieten met poly-DL-lactide. Een nauw contact tussen hydroxyapatiet partikels en bot had zich gevormd tijdens de degradatie van het hydroxyapatiet/poly-DL-lactide composiet. De vorm van het HA/P-DL-LA composiet was daarbij duidelijk veranderd, dit in tegenstelling tot de vorm van de HA/P-L-LA

composieten die onveranderd bleef, zelfs na twaalf maanden implantatie. Het botcontact dat voor deze composieten werd waargenomen beperkte zich tot kleine gebiedjes gelegen tegen zowel polylactide als tegen hydroxyapatiet. De polylactiden met en zonder hydroxyapatiet zijn ook subcutaan geïmplantéerd. Deze implantaten werden ingekapseld in fibreus weefsel met voornamelijk meerkernige cellen aan de interface. Degradatie van de poly-L-lactiden (met of zonder hydroxyapatiet) werd niet waargenomen, maar degradatie van poly-DL-lactide (met of zonder hydroxyapatiet) vertoonde ook op deze implantatieplaats duidelijke tekenen van degradatie. Naast het sporadische botcontact werd de voornaamste weefselreactie van zowel in de tibia als subcutaan geïmplanteerde composieten gevormd door een bindweefselinkapseling die grotendeels bestond uit fibroblasten en meerkernige cellen.

Het composiet van hydroxyapatiet en poly-DL-lactide heeft enige bot bindende eigenschappen en is waarschijnlijk degradeerbaar zonder dat er kristallijne restanten achterblijven in het weefsel. De hoeveelheid van 50 gewichts procenten hydroxyapatiet die initieel in het composiet aanwezig was, bleek in deze studie te weinig om snel (binnen 6 weken) een botbinding te bewerkstelligen. Verder onderzoek naar de verbetering van de botbindende en mechanische eigenschappen in de toepassingsgebieden is gerechtvaardigd en noodzakelijk alvorens klinische toepassing kan plaatsvinden. De toepassing van hoogmoleculaire kristallijne polylactiden, met of zonder hydroxyapatiet, moet met enige scepsis beschouwd worden zolang de volledige degradatie nog niet is aangetoond.

Curriculum vitae

Alice van Slidregt was born on March 25th 1962 in Voorburg. After graduating (V.W.O.) from high school (Erasmuscollege Zoetermeer) in 1980, she worked for 18 months in the University Hospital Leiden as a student nurse. In 1982 she started studying Biology at the University of Leiden and graduated in 1988 with a specialization in Medical Biology. During her studies, she performed practical work (12 months) at the Institute for Experimental Gerontology (IVEG-TNO, Rijswijk). At the Biology Department of the University of Leiden she performed practical work (6 months) on the purification of proteins for monoclonal antibody production. In 1988 she started as a Ph.D. student under the combined supervision of the Laboratory for Otobiology and Biocompatibility (Head: Dr. C.A. van Blitterswijk), the ENT Department (Head: Prof. Dr. J.J. Grote) and the Biomaterials Department (Head: Prof. Dr. K. de Groot), all of which are participants of the Leiden Biomaterials Research Group. She worked on the biocompatibility of hydroxyapatite/polylactide composites.

Yvonne Bovell is greatly acknowledged for english text corrections of the Introduction and Discussion.