

SAMENVATTING *

Als gevolg van letsel of als gevolg van een ontsteking kan een trommelvlies blijvend een perforatie oplopen, hetgeen dikwijls resulteert in een verslechtering van het gehoor en een verhoogde vatbaarheid voor infecties. Tot 1950 kwam de behandeling van een geperforeerd trommelvlies neer op een blijvend bedekken van het vlies met lichaamsvreemd materiaal, bijvoorbeeld met de luchtblaas van vissen, India rubber, ei-membraan en ook siliconenrubber is wel toegepast. Deze behandeling leidde zelden tot gehoorverbetering.

Sinds die tijd kwam een chirurgische techniek in zwang die tot doel heeft een funktionele rekonstruktie van het trommelvlies te bewerkstelligen. Het principe van deze techniek, genaamd myringoplastiek, is gebaseerd op het bedekken van de trommelvliesperforatie met een dun collageen-bindweefselachtig vlies, de zogenaamde 'plastiekklap'. De plastiekklap moet functioneren als een ondersteunende structuur voor de aangroei van nieuw epitheelweefsel vanaf de -geactiveerde- wondranden van de perforatie. Gedurende het helingsproces, dat een aantal maanden in beslag kan nemen, behoort de ondersteunende structuur geleidelijk aan geabsorbeerd te worden.

Bijna alle materialen die tot nu toe als plastiekklap werden gebruikt zijn van biologische oorsprong -bijvoorbeeld fascie van de patiënt zelf- hetgeen in de praktijk betekent dat de snelheid waarmee ze geabsorbeerd worden onvoldoende controleerbaar is. Myringoplastiek-operaties kunnen dan ook falen vanwege een voortijdige desintegratie van plastiekklappen van het konventionele weefsel-type en ook kunnen zulke plastiekklappen een aanmerkelijke antigeniteit veroorzaken of een vrij intense ontstekingsreactie van het aanliggende weefsel. Nog een andere reden waarom plastiekklappen van biologische oorsprong minder geschikt kunnen blijken te zijn, houdt verband met de behandeling van gekompliceerde trommelvliesdefecten, bijvoorbeeld in geval van totale of subtotale perforaties, atelektatische oren of congenitale afwijkingen. Ten behoeve van de behandeling van dergelijke defecten worden aan de plastiekklappen dikwijls zodanig

specifieke mechanische eisen en vormeisen gesteld, dat deze niet op bevredigende wijze geprepareerd kunnen worden uit de tamelijk zachte weefsels van biologische oorsprong.

Biomedisch onderzoek gedurende de afgelopen 20 jaar laat zien dat er vanuit de genees- en heelkunde een toenemende belangstelling is voor de toepassing van synthetische, in het lichaam afbreekbare kunststoffen die op een voorspelbare wijze geabsorbeerd worden en daarbij op een voorspelbare wijze hun mechanische sterkte verliezen.

Het aantal goed funktionerende synthetische, biodegradeerbare kunststoffen is vooralsnog beperkt. De poly(α -hydroxyzuren) -met name poly(glycolzuur), poly(melkzuur) en hun co-polymeren- en de poly(α -aminozuren) vertegenwoordigen twee belangrijke klassen van synthetische, biodegradeerbare kunststoffen die, -ten dele alleen nog in de dier-experimentele situatie, maar ten dele ook reeds in de klinische situatie- toegepast zijn, of nog steeds worden: bijvoorbeeld als in het lichaam afbreekbaar hechtmateriaal ter vervanging van het reeds eeuwen gebruikte hechtmateriaal op natuurlijke eiwitbasis, als afdekking van brandwonden, als gecontroleerd doseringssysteem voor medicijnen, en als biodegradeerbare protheses in de orthopedische en plastische aangezichtschirurgie.

Het onderzoek waarover in dit proefschrift gerapporteerd wordt -en in samenhangend verband beschreven in hoofdstuk I- heeft zich gericht op de volgende drie hoofd-onderwerpen:

- De chemie en karakterisering van poly(D,L-melkzuur), een synthetische, in het lichaam afbreekbare kunststof die uitvoerig toegepast en geëvalueerd werd als tijdelijk trommelvliessubstituut in dier-experimenteel onderzoek (hoofdstukken II, III, IV en V);
- De chemie van lineaire, alternerende polydepsipeptiden, een potentieel nieuwe klasse van synthetische, in het lichaam afbreekbare kunststoffen (hoofdstuk VI);
- De toepassing en evaluatie van een aantal in het lichaam afbreekbare, en ook microporeuze, niet-afbreekbare synthetische

kunststoffen als (tijdelijke) trommelvliessubstituten in dier-experimentele studies (experimentele myringoplastiek).

Hoogmolekulaire poly(D,L-melkzuur), dat geschikt is om verwerkt te worden tot implantaten, wordt bij voorkeur gesynthetiseerd door middel van de ring-openingpolymerisatie van de heterocyclische 6-ring diester D,L-lactide (smeltpunt 126°C) in de smeltfase, geïnitieerd door een geschikte initiator. De opgedane ervaring dat hoogmolekulaire poly(D,L-melkzuur) niet op een reproduceerbare wijze gesynthetiseerd kon worden via de smeltfase polymerisatie van D,L-lactide in de aanwezigheid van tetrafenyltin als de initiator, heeft geleid tot een meer gedetailleerde studie van de chemie van dit biodegradeerbare poly(α -hydroxyzuur).

Uit literatuurgegevens was tot op heden niet eenduidig te conkluderen of D,L-lactide (smeltpunt 126°C) bestaat uit het zogenaamde meso-lactide molecuul -dat wil zeggen dat ieder lactide molecuul gevormd wordt door één linksdraaiend en één rechtsdraaiend lactaat residu- dan wel dat D,L-lactide in feite een 1:1 racemaat is van L-,L-lactide en D-,D-lactide, die beide een smeltpunt 95°C hebben. Op basis van röntgendiffractie-onderzoek, beschreven in hoofdstuk II, kon eenduidig vastgesteld worden dat D,L-lactide (smeltpunt 126°C) inderdaad het bedoelde 1:1 racemaat is, hetgeen onder meer impliceert dat poly(D,L-melkzuur) stereo-isotactische ketendelen kan bevatten van meer dan twee links- of rechtsdraaiende lactaat residuen.

D,L-lactide kan beschouwd worden als een gemodificeerd lacton, in die zin dat de ringverbinding twee estergroepen bevat en een lacton-ring gewoonlijk één. Hoewel in diverse publikaties mechanismen zijn voorgesteld voor de initiatie of -in ruimere zin- voor de polymerisatie van lactonen, is het precieze mechanisme -of zijn de precieze mechanismen- nog steeds in discussie. Daarenboven zijn er zo goed als geen gegevens beschikbaar over de interactie tussen de initiator en het lacton monomeer juist voor de feitelijke ring-opening plaats vindt. Dit laatste is met name het onderwerp geweest van het onderzoek besproken in hoofdstuk III. De gevolgde werkwijze hield in dat

met behulp van IR-spektroskopie de complexvorming in oplossing onderzocht werd van een aantal initiatoren met D,L-lactide, L-lactide of glycolide. De (potentiële) initiatoren waren tetrafenyltin, het tin-(II)-zout van 2-ethylhexaanzuur, tintetrachloride, aluminiumbromide en triisobutylaluminium (TIBA). Wanneer equimolaire oplossingen van initiator en monomeer in benzene of toluene bijeengevoegd werden, werden alleen complexen waargenomen van aluminiumbromide met D,L-lactide of glycolide en van TIBA met D,L-lactide of glycolide. De complexvorming werd meer gedetailleerd bestudeerd door de initiator en monomeer concentraties te variëren. De resultaten van de complexvormingsstudie in combinatie met overwegingen van theoretische aard, leidde tot de konklusie dat complexen gevormd worden door coördinatie van het aluminiumatoom van de initiator met een carbonylzuurstof van het monomeer, terwijl op basis van op dat moment bekende theoriën coördinatie met een etherzuurstof van het monomeer meer in de lijn der verwachting lag. De overeenkomstige polymeren werden gevormd wanneer onder water-vrije omstandigheden TIBA werd toegepast als initiator. Wanneer aluminiumbromide als initiator werd toegepast, werden alleen polymeren verkregen na toevoeging van spore-hoeveelheden water. Dit leidde tot de konklusie dat in geval van $AlBr_3$ het werkelijk initiërende deeltje HBr is, en dat de polymerisatie geïnitieerd door TIBA met een grote waarschijnlijkheid start via een coördinatie-insertie van het lacton monomeer in de aluminium-koolstofband.

De niet-reproduceerbaarheid van het -gemiddelde- polymeer-molekulgewicht tijdens de smeltfase polymerisatie van D,L-lactide geïnitieerd door tetrafenyltin werd reeds genoemd. In hoofdstuk IV worden de resultaten beschreven van een studie die tot doel had de relatie te onderzoeken tussen de omstandigheden waaronder de smeltfase polymerisatie wordt uitgevoerd en het molekulgewicht en de molekulgewichtsverdeling van de gevormde polymeren. De studie betrof zogenaamde 'enkelvoudige' polymerisaties, 'meervoudige' polymerisaties (waarbij 4 of 8 polymerisatiereacties gelijktijdig werden voorbereid en uitgevoerd) en 'tijdsafhankelijke' polymerisaties. 'Enkelvoudige' polymerisaties uitgevoerd bij konstante initiatorconcentraties resulteerden

in een grote spreiding van niet-reproduceerbare molekulgewichten. "Meervoudige" polymerisaties uitgevoerd bij konstante initiator-koncentraties resulteerden daarentegen in bijna identieke molekulgewichtsverdelingen. Wanneer 'meervoudige' polymerisaties bij verschillende initiator-koncentraties werden uitgevoerd, werd geen inverse relatie gevonden tussen initiator-koncentratie en polymeer-molekulgewicht. Zowel de 'enkelvoudige' als de 'meervoudige' smeltfase polymerisaties resulteerden in tamelijk brede molekulgewichtsverdelingen. Op basis van resultaten van smeltfase polymerisaties van D,L-lactide uitgevoerd in de aanwezigheid van hydrolyse-produkten van lactide werd vastgesteld dat deze laatste de hoogte van het polymeer-molekulgewicht vermoedelijk sterk nadelig beïnvloeden. Polymerisaties van het 'meervoudige'-type werden ook uitgevoerd om de invloed te bestuderen van de polymerisatietijd op de omzetting van D,L-lactide en op het polymeer-molekulgewicht. Uit de resultaten van deze 'tijdsafhankelijke' polymerisatiestudies werd gekonkludeerd dat een tamelijk langzame polymerisatie van D,L-lactide, die voorafgegaan wordt door een korte inductieperiode, resulteert in een maximum polymeer-molekulgewicht dat vervolgens enigermate afneemt tot een konstante waarde. Tenslotte wordt aan het eind van hoofdstuk IV beredeneerd waarom de polymerisatie van D,L-lactide in de smeltfase, geïnitieerd door tetrafenyltin niet volgens een 'levend' mechanisme verloopt.

Er bestaan duidelijke aanwijzingen dat de wijze van degradatie van in het lichaam afbreekbare kunststoffen mede beïnvloed wordt door het polymeer-molekulgewicht en de molekulgewichtsverdeling. Tot op heden zijn gegevens over het molekulgewicht van poly(D,L-melkzuur) -of van poly(L-melkzuur)- maar in beperkte mate voorhanden. Nog minder systematische gegevens zijn tot nu toe gepubliceerd over de molekulgewichtsverdeling als onderdeel van de karakterisering van poly(melkzuur). Daarom werden meerdere poly(D,L-melkzuur) monsters uit deze studie met gewichtsgemiddelde molekulgewichten \bar{M}_w in de orde 15.000 - 350.000 uitvoerig gekarakteriseerd. De resultaten zijn weergegeven in hoofdstuk V. Molekulgewichtsverdelingen van de monsters werden bepaald door middel van hoge-druk-gel-permeatie-chromato-

grafie. De gevolgde methode bestond uit een universele kalibratie van de GPC-kolommen op basis van polystyreen-standaards met zeer smalle molekulgewichtsverdelingen en een wiskundig iteratieproces met behulp waarvan de parameters van de Mark-Houwink relatie vastgesteld konden worden. Van negen op deze wijze gekarakteriseerde monsters met gewichtsgemiddelde molekulgewichten 35.000 - 350.000 werden waarden voor \bar{M}_w/\bar{M}_n gevonden tussen 2 en 3. Twee monsters met lagere \bar{M}_w 's hadden aanzienlijk bredere verdelingen. Daarnaast werden de relevante osmometrie en viskosimetrie gegevens gepresenteerd. Tenslotte werd het effect van *in vitro* hydrolytische degradatie op de molekulgewichtsverdeling van twee monsters poly(D,L-melkzuur) door middel van GPC bestudeerd. Verassenderwijs werden toen ook waarden voor $\bar{M}_w/\bar{M}_n < 2$ gevonden en zelfs een waarde zeer dicht bij één.

Zoals reeds vermeld in de aanhef van deze samenvatting, vertegenwoordigen de poly(α -hydroxyzuren) en de poly(α -aminozuren) twee belangrijke klassen van geaccepteerde, in het lichaam afbreekbare kunststoffen. Anderssoortige in het lichaam afbreekbare synthetische kunststoffen met verschillende degradatiekarakteristieken zouden een waardevolle aanvulling hierop kunnen betekenen -bijvoorbeeld een kunststof die in zich eigenschappen combineert van zowel een α -hydroxyzuur homo-polymeer en van een α -aminozuur homo-polymeer. Daarom wordt in hoofdstuk VI aandacht besteed aan een potentieel nieuwe klasse van in het lichaam afbreekbare synthetische kunststoffen: de lineaire, alternerende polydepsi-peptiden, dat wil zeggen polymeerketens waarin ester en amide groepen elkaar afwisselen terwijl ze gescheiden zijn door steeds één koolstofatoom. Tot nu toe konden lineaire, alternerende polydepsi-peptiden slechts op zeer kleine schaal gesynthetiseerd worden volgens bepaalde multi-step syntheses, ontwikkeld voor de bereiding van polypeptiden. In hoofdstuk VI wordt beredeneerd dat, in principe, lineaire, alternerende polydepsi-peptiden ook in één stapen op grotere schaal gesynthetiseerd kunnen worden via een lacton of lactam type ring-opening polymerisatie van 2,5-morfolinedionen. Deze laatste heterocyclische 6-ring verbindingen, die in de literatuur maar sporadisch beschreven zijn, bevatten zowel een α -hydroxyzuur residu als een α -aminozuur residu. In

de huidige studie werd gevonden dat 2,5-morfolinedionen slechts met aanzienlijke moeite gesynthetiseerd konden worden via een cycliseringsreactie van een α -halogeenacyl- α -aminozuur. Kleine hoeveelheden ongesubstitueerd 2,5-morfolinedion konden worden bereid via sublimatie van het natrium zout van N-chlooracetyl-glycine in de aanwezigheid van 'aktief' koper; door de aanwezigheid van het koper wordt vermoedelijk de thermische geleidbaarheid van de te verwarmen massa sterk verhoogd waardoor teer-vorming duidelijk vermindert, terwijl niet uitgesloten wordt dat het koper ook een katalyserend effect heeft op de ring-sluitingsreactie. 6-Methyl-2,5-morfolinedion kon wat eenvoudiger gesynthetiseerd worden via droge destillatie van het natrium-zout van N-D,L- α -broompropionylglycine. Ongesubstitueerd 2,5-morfolinedion bleek niet of nauwelijks oplosbaar in 'gewone' organische oplosmiddelen. Het is daarentegen zeer goed oplosbaar in water. Ongesubstitueerde 2,5-morfolinedion kon gezuiverd worden via omkristallisatie uit een ruime overmaat droge methanol. De moleculaire structuur van 2,5-morfolinedion, 6-methyl-2,5-morfolinedion en hun lineaire uitgangsverbindingen konden geverifieerd worden door middel van IR-, $^1\text{H-NMR}$ -, en massaspektrometrie. Gebaseerd op deze resultaten en theoretische overwegingen werd gekonkludeerd dat de ringsluiting van een α -halogeenacyl- α -aminozuur vermoedelijk gehinderd wordt door de hoge trans-cis energie barrière voor de (niet-gealkyleerde) amide band. Aangezien slechts geringe hoeveelheden 2,5-morfolinedion en 6-methyl-2,5-morfolinedion gesynthetiseerd konden worden, kon de polymeriseerbaarheid van deze heterocyclische verbindingen vooralsnog niet systematisch onderzocht worden en werd slechts een beperkt aantal lacton-type ring-opening-polymerisatiepogingen uitgevoerd. De pogingen ongesubstitueerde 2,5-morfolinedion in de smeltfase te polymeriseren met tetrafenyltin als initiator resulteerden slechts in sterke teer-vorming, vermoedelijk als gevolg van de hoge reaktietemperatuur die noodzakelijk was vanwege het hoge smeltpunt van 2,5-morfolinedion (191-193°C). Aangezien 6-methyl-2,5-morfolinedion bij een veel lagere temperatuur smelt -96°C- konden smeltfasepolymerisaties onder aanzienlijk mildere omstandigheden worden uit-

gevoerd. Wanneer het tin-(II)-zout van 2-ethylhexaanzuur werd gebruikt als initiator, werden glasachtige, 'kunststofachtige' producten verkregen, die helaas niet op molekulgewicht gekarakteriseerd konden worden vanwege onoplosbaarheid in tetrahydrofuraan, het standaardoplosmiddel van de beschikbare lage-druk-gel-permeatie-chromatograaf. IR-spektroskopisch onderzoek wees op de vorming van een lineair produkt. Wanneer geen initiator werd toegevoegd, werd, onder dezelfde polymerisatieomstandigheden, naast een oligomeer een grote hoeveelheid niet-gereageerd monomeer teruggewonnen.

De laatste twee hoofdstukken zijn gewijd aan de toepassing van een aantal in het lichaam afbreekbare en microporeuze, niet-afbreekbare synthetische kunststoffen als (tijdelijke) trommelvliessubstituten in dier-experimentele studies (experimentele myringoplastiek).

Hoofdstuk VII begint met een beschrijving van de anatomie en functie van het menselijk trommelvlies en met een historisch overzicht van de behandeling van geperforeerde trommelvliezen. Vervolgens wordt een verantwoording afgelegd van de filosofie dat (tijdelijke) trommelvliessubstituten van synthetische kunststoffen een waardevolle aanvulling kunnen betekenen op de momenteel toegepaste plasticlappen van biologische oorsprong (zie ook de aanhef van deze samenvatting). In het tweede deel van hoofdstuk VII worden de resultaten beschreven van de experimentele myringoplastiek-studies. Daartoe werden trommelvliessubstituten gemaakt van diverse, in het lichaam afbreekbare poly(α -hydroxyzuren) en poly(α -aminozuren), en gemaakt van een aantal microporeuze poly(tetrafluoretheen) membranen en van een microporeus bisfenol-A poly(carbonaat) membraan, geïmplanteerd in oren van ratten en honden, en als een referentie onderhuids. Weefselreacties werden gedurende een periode van totaal een jaar bestudeerd. Van de onderzochte, in het lichaam afbreekbare synthetische kunststoffen bleek poly(β -benzyl-L-aspartaat-co-L-leucine) 50/50 de geringste weefselreactie te veroorzaken, terwijl het nieuw gevormde trommelvlies het best overeenkwam met een normaal trommelvlies. Een andere doelstelling, de vorming van een 'versterkt' trommelvlies, lijkt in

principe gerealiseerd te kunnen worden door als weefselingroei-ondersteunende structuur een inert, zeer dun en zeer poreus poly(tetrafluoretheen) membraan te gebruiken dat bij voorkeur geïmplanteerd wordt als een 'composiet-substituut' met een in het lichaam afbreekbare synthetische kunststof. Op basis van de gevonden resultaten worden enkele aanbevelingen gedaan voor verder (klinisch) onderzoek.

Tenslotte wordt in hoofdstuk VIII een deel van het myringoplastiek dier-experimenteel onderzoek, reeds beschreven in hoofdstuk VII, in meer gedetailleerde vorm uitgewerkt, waaronder de fabricage van de (tijdelijke) synthetische trommelvliessubstituten.

*TITEL: Ontwikkeling van in het lichaam afbreekbare kunststoffen voor toepassing in de myringoplastiek.

LEVENSLLOOP

Frederik Emiel Kohn werd op 28 maart 1947 geboren te Hengelo (o) alwaar de openbare kleuterschool, lagere school en het openbaar gymnasium De Bataafse Kamp werden bezocht. Na het behalen van het diploma gymnasium- β ging hij in 1965 chemische technologie -voorafgegaan toen nog door één jaar algemene propadeuse-studeren aan de TH Twente. In 1969 werd het baccalaureaats-diploma en in 1972 het ingenieursdiploma behaald, beide met als hoofdrichtingen macromoleculaire materiaalkunde en -techniek. Vervolgens werden de militaire verplichtingen vervuld en was hij in 1974 en 1975 werkzaam als research fellow in de Biomedical Engineering Unit van het North Staffordshire hospital in Stoke-on-Trent, Engeland. In de periode medio 1976 - medio 1981 werd het onderzoek verricht dat ten grondslag ligt aan dit proefschrift en was er een tijdelijk dienstverband van 3½ jaar als wetenschappelijk ambtenaar aan de afdeling Keel- Neus- en Oorheelkunde van de VU te Amsterdam, terwijl de overige promotietijd gefinancierd werd door de TH Twente.

Gedurende bijna de gehele onderzoeksperiode was Frits Kohn gestationeerd binnen de vakgroep Macromoleculaire Chemie en Materiaalkunde, afdeling Chemische Technologie, TH Twente. Sinds 1 oktober 1981 is hij werkzaam binnen de afdeling produktontwikkeling van Firet B.V. te Veenendaal, producent van non-woven vliezen.