



IGF-Vorhaben-Nr.: 19019 BG
Laufzeit: 01.02.2016 – 31.01.2019

Antibakterieller Wirkstoff in Kunststoffimplantaten aus PEEK und PLA - Wirksamkeit und Einfluss auf die Implantateigenschaften

Harald Oehler, Niels Brauch, Ingo Alig
Fraunhofer-Institut für Betriebsfestigkeit und Systemzuverlässigkeit LBF, 64289 Darmstadt, Germany

Claudia Rode, Ralf Wyrwa, Matthias Schnabelrauch
INNOVENT e.V., Prüssingstr. 27B, 07745 Jena, Germany

Problemstellung

Implantat-assoziierte Infektionen durch Keimkontamination und verminderte Immunabwehr führen häufig zu physischen und psychischen Belastungen des Patienten, da nicht selten das von Bakterien befallene Implantat wieder entfernt werden muss. Zudem entstehen enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Entsprechend sind Implantate, die über einen langen Zeitraum hinweg eine antibakterielle Wirkung aufweisen, für die Implantologie von großem Interesse^{1,2}. Da zunehmend sowohl bioabbaubare als auch nicht abbaubare Kunststoffimplantate eingesetzt werden, ist es wünschenswert, einen antibakteriellen Wirkstoff in die Kunststoffe einzuarbeiten, welcher im Körper über einen langen Zeitraum wirksam bleibt und Infektionen verhindert.

Die Einarbeitung soll bereits beim Compoundieren des Kunststoffgranulats erfolgen. Dabei soll der Wirkstoff möglichst gut dispergiert werden und der Abbau des Wirkstoffs durch die thermische Belastung während der Verarbeitung so gering wie möglich sein.

¹ C. Krettek, C. Müller, R. Meller, M. Jagodzinski, F. Hildebrand, R. Gaulke; *Der Unfallchirurg* 115 (2012) 315-322.

² H. Gollwitzer, H. Meyer, A. Stemberger, *Implantatinfektionen und Strategien zur antibakteriellen Beschichtung*, *Trauma Berufskrankheit* 5 (Suppl 2) (2003) 347–352.

Zinkoxid (ZnO) wird im Bereich von Kosmetik und Wundbehandlung seit langem als antibakterieller Wirkstoff eingesetzt und ist für diese Anwendungen erprobt und zugelassen. Es hat im Vergleich zu Silberionen ein breiteres therapeutisches Fenster zwischen antibakteriellem Effekt und zytotoxischer Wirkung. Um die antibakterielle Wirkung von ZnO sowie den Einfluss der Prozessbedingungen während der Kunststoffverarbeitung auf die physikalischen und biochemischen Eigenschaften zu untersuchen, wurden Komposite aus Polylactid (PLA) mit Tricalciumphosphat (TCP) sowie Polyetheretherketon (PEEK) mit Hydroxylapatit (HA) als Füllstoffe hergestellt und mit verschiedenen ZnO-Anteilen versetzt. Mit PLA und PEEK wurden ein bioabbaubares und ein nicht abbaubares Matrixpolymer einbezogen. Zum Verständnis des Zusammenspiels von Verarbeitungsbedingungen und physikalischen und biochemischen Eigenschaften – insbesondere der antibakteriellen Wirkung – wurden die Prozessparameter systematisch variiert. Struktur, Eigenschaften und antibakterielle Wirkung der verschiedenen Materialkombinationen wurden nach den Verarbeitungsschritten Compoundieren und Spritzgießen sowie nach Einlagerung in physiologischer Lösung umfassend charakterisiert.

Materialien und Vorbehandlung

Die Materialien, die Zusammensetzung der Komposite und die Prozessbedingungen wurden auf Basis eines Vorgängerprojektes³ sowie von Voruntersuchungen (siehe unten) festgelegt. Als Matrixkunststoffe wurden zwei Polylactid-Typen und Polyetheretherketon und als Füllstoffe Tricalciumphosphat (TCP) bzw. Hydroxylapatit (HAP) verwendet. Den Kompositen wurden verschiedene Anteile von Zinkoxid (bis zu 15 Masse-%) zugesetzt. Für PLA werden im folgenden Ergebnisse mit PLA 3001D (Spritzgießtyp mit einem D-Isomeranteil von 1,5 %, Molmasse des Granulates $M_w = 143600$ g/mol) vorgestellt. In das PLA-Basispolymer wurden 0 und 30 % TCP und verschiedene ZnO-Anteile bis zu 15 % eingearbeitet (alle Angaben in Masse-%).

In die PEEK-Komposite wurden 0 und 10 % Hydroxylapatit (HAP) und ZnO-Anteile bis zu 15 Masse-% eincompoundiert. Als Kontrollproben wurden für beide Polymere Komposite und Probekörper ohne ZnO hergestellt.

³ M. Bargmann, H. Kothe, B. Steinhoff, I. Alig, C. Rode, R. Wyrwa, M. Schnabelrauch, PLA-Based Biodegradable and Cytocompatible Implant Materials: Material Development, Processing and Properties Journal of Materials Science and Engineering B 3 (2013) 619-633.

In den Voruntersuchungen zeigte eine ZnO-Konzentration von 3 % in PLA eine antibakterielle Wirksamkeit, ohne dass ZnO bereits zytotoxisch wirkte (siehe Abb. 1). Als antibakterielle Wirksamkeitsgrenze wurde für den „Colony Forming Units Test“ (CFU) ein Anteil von weniger als 0,1 % Bakterien (*E. coli*) im Vergleich zu der mit Bakterien besiedelten, unwirksamen Kontrollprobe festgelegt. Diese ZnO-Konzentration wurde für die weiteren Versuche verwendet. In die PEEK-Komposite wurde eine antibakteriell wirksame und nicht zytotoxische Zinkoxidkonzentration von 10 % eingearbeitet und untersucht.

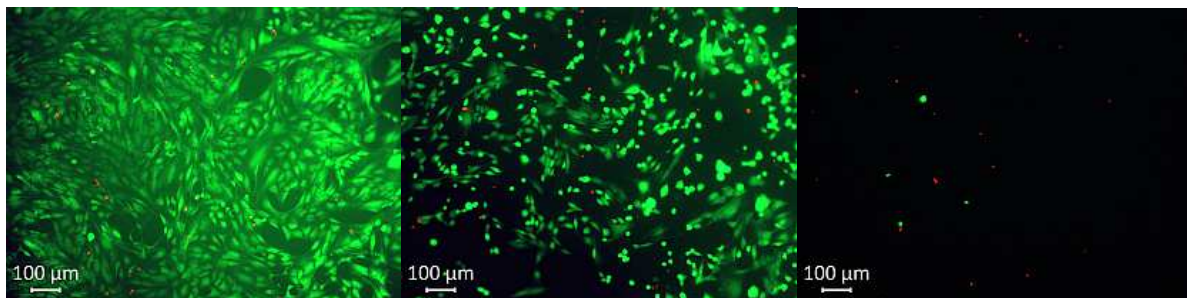


Abb. 1: Zellbesiedelungsexperimente mit MC3T3-E1 Zellen auf Kompositen aus PLA mit 30 % TCP sowie 2 % ZnO (links), 3 % ZnO (Mitte) und 4 % ZnO (rechts) nach Lagerung der Proben in phosphatgepufferter physiologischer Lösung (PBS) bei 60 °C für 24 Stunden.

Um eine antibakterielle Wirkung des eingearbeiteten ZnO zu erzielen, erwies sich eine Oberflächenvorbehandlung der spritzgegossenen Probekörper als erforderlich. Die PLA-Prüfkörper wurden hierzu für 72 Stunden bei 45 °C in Wasser eingelagert. Für PEEK-Prüfkörper erwies sich 5 min ätzen in Luftplasma als einfaches und geeignetes Verfahren. Die spritzgegossenen und oberflächenbehandelten Probekörper wurden in Probengläser mit phosphatgepufferter physiologischer Lösung (PBS) eingebracht und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C eingelagert. Die Probekörper wurden zu definierten Zeiten (4 bis 268 Tage) entnommen und mit verschiedenen chemischen, physikalischen und biochemischen Charakterisierungsmethoden wie Differenzkalorimetrie (DSC), Gelpermeationschromatographie (GPC), Sorptionsanalyse, Wägung, Zugprüfung, Messungen der Kerbschlagfestigkeit und Elektronenmikroskopie sowie dem BTG- (BacTiter-Glo™) und dem CFU-Test (CFU: Colony Forming Units) untersucht.

Variation der Prozessbedingungen

Die Verarbeitung der PLA- und PEEK-Komposite erfolgte mit einem Zweischneckenknetzer ZSK18 der Coperion Werner & Pfeleiderer GmbH & Co. KG. Die Prozessbedingungen beim

Compoundieren wurden anhand von Vorarbeiten und Voruntersuchungen so festgelegt, dass eine gute Dispergierung der Füllstoffe bei möglichst geringem Molmassenabbau erreicht wurde. Als Kompromiss zwischen guter Dispergierung und möglichst geringem Abbau wurden für die nachfolgenden Versuche für die PLA-Komposite ein Massedurchsatz von 5 kg/h und eine Schneckendrehzahl von 600 min^{-1} mit einem Temperaturprofil in der Verfahreseinheit von $170 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ }^\circ\text{C}$ für Aufschmelz-, Homogenisierungs- bzw. Austragszone verwendet. Die entsprechenden Parameter für PEEK-Komposite waren ebenfalls 5 kg/h und 600 min^{-1} sowie $340 \text{ }^\circ\text{C}$, $380 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $380 \text{ }^\circ\text{C}$ für die Zonen der Verfahreseinheit.

Die Spritzgusskörper (Zugstäbe Typ A nach DIN EN ISO 3167) aus den PLA- und PEEK-Kompositen wurden mit einer Spritzgießmaschine des Typs Demag 2 Multi 80/420-310h/220 V der Firma Sumitomo (SHI) Demag hergestellt. Mit dem Ziel, Kristallinität und Eigenschaften zu variieren und diese mit den antibakteriellen Eigenschaften zu vergleichen, wurden die Werkzeugtemperatur T_w , die Schmelzetemperatur T_s und die Einspritzdauer t im Spritzguss systematisch verändert. Die verwendeten Parametersätze sind in den Bildunterschriften aufgeführt.

Einfluss der Spritzgießbedingungen und der Konditionierung auf Eigenschaften und biologische Wirkung

Die Kristallinität wurde aus DSC-Messungen nach dem Spritzguss, nach der Konditionierung und während der Einlagerung bestimmt. Es zeigt sich, dass sich weder die unterschiedlichen Spritzgießparameter noch die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Komposite signifikant auf die Kristallinität auswirken. Diese lag für alle Komposite des PLA 3001D bei etwa 15 %. Bruchspannung, Bruchdehnung und Schlagzähigkeit zeigen ebenfalls keine oder nur eine geringe Abhängigkeit von den Spritzgießparametern Schmelze- und Werkzeugtemperatur sowie Einspritzdauer. Die Zugabe von TCP verringert die Bruchdehnung und die Bruchspannung, und der E-Modul steigt an.

Wie oben erwähnt, ist eine Oberflächenvorbehandlung der spritzgegossenen Probekörper notwendig, um eine antibakterielle Wirkung des eingearbeiteten ZnO zu erreichen. Die Vorbehandlung (PLA: 72 h bei $45 \text{ }^\circ\text{C}$ in Wasser, PEEK: 5 min in Luftplasma) wurde so optimiert, dass eine antibakterielle Wirkung erreicht wird, jedoch keine signifikanten Veränderungen der Kristallinität oder der mechanischen Eigenschaften auftreten.

Untersuchungen zum In-Situ-Abbau in physiologischer Lösung

Für die Abbauuntersuchungen wurden die spritzgegossenen Zugstäbe der PLA- und PEEK-Komposite im Schüttelinkubator in PBS bei 37 °C eingelagert. Nach der Entnahme aus der PBS-Lösung und sorgfältigem Entfernen der Flüssigkeit von der Oberfläche wurde die Masse im feuchten Zustand (m_w , w: „wet“) und nach Rücktrocknung im Vakuum (m_r) bei Raumtemperatur bestimmt. Hieraus lässt sich der Wasseranteil $((m_w - m_r)/m_r)$ der eingelagerten Proben in Abhängigkeit von der Einlagerungszeit bestimmen (Abb. 2, oben). Mit der Ausgangsmasse im trockenen Zustand (m_0) lässt sich der Masseverlust der Probekörper $((m_r - m_0)/m_0)$ berechnen (Abb. 2, Mitte).

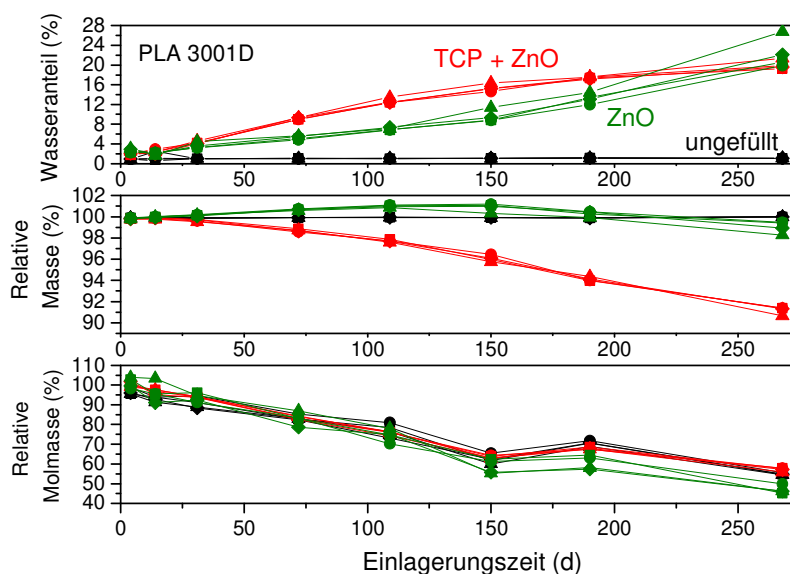


Abb. 2: Wasseraufnahme (oben), Masseverlust (Mitte) und relative Molmasse (unten) von Probekörpern aus PLA ohne Füll- oder Wirkstoffe (schwarze Kurvenschar), mit 3 % ZnO (grüne Kurvenschar) und PLA mit 3 % ZnO und 30 % TCP (rote Kurvenschar) als Funktion der Einlagerungszeit in PBS bei 37 °C. Die Symbole kennzeichnen unterschiedliche Spritzgießbedingungen: Kreise: $T_w = 45$ °C, $T_s = 175$ °C, $t = 0,55$ s; Quadrate: $T_w = 25$ °C, $T_s = 175$ °C, $t = 0,55$ s; Dreiecke: $T_w = 45$ °C, $T_s = 200$ °C, $t = 0,55$ s, Rauten: $T_w = 45$ °C, $T_s = 175$ °C, $t = 1,96$ s.

Die Kurven sowohl für die Wasseraufnahme als auch für den Masseverlust in Abb. 2 (oben und Mitte) gruppieren sich nach der Zusammensetzung der Komposite (verschiedene Farben), und es ist keine Aufspaltung nach den Spritzgießbedingungen erkennbar. Dies kann mit dem vernachlässigbaren Einfluss der Spritzgießparameter auf die kristalline Struktur erklärt werden. Das ungefüllte PLA (schwarze Kurvenschar) zeigt über einen Zeitraum von 9 Monaten weder eine signifikante Wasseraufnahme noch einen Massenverlust. Die frühzeitige Wasseraufnahme der Komposite mit TCP und ZnO (rote Kurvenschar in Abb., 2 oben) führt zu einer schnelleren Massenabnahme in Vergleich zu den anderen Proben (Abb. 2, Mitte). Thermogravimetrische Untersuchungen zeigen für

die untersuchte Zusammensetzung, dass anorganische und organische Anteile im gleichen Verhältnis abnehmen. Dies deutet auf ein Auswaschen beider Komponenten hin. Im Unterschied zum Komposit mit TCP und ZnO steigt die Wasseraufnahme im Komposit mit ZnO jedoch ohne TCP stetig an (grüne Kurvenschaar in Abb. 2 oben). Dieses Verhalten lässt auf eine Adsorption an den Oberflächen des ZnO schließen. Eine starke Beschleunigung des Masseverlustes (untere Grafik) wie beim TCP tritt nicht auf. Die Trockenmasse nimmt sogar erst geringfügig zu, bevor sie sehr langsam abfällt. Ersteres deutet auf eine starke Wechselwirkung des absorbierten Wassers mit der ZnO-Oberfläche hin.

Wie Abbildung 2 (unten) zeigt, nimmt die Molmasse während der Einlagerung für alle PLA-Komposite kontinuierlich mit der Einlagerungszeit ab. Der Molmassenabbau zeigt im Gegensatz zur Wasseraufnahme und zur Massenreduktion keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Füllstoffen. Die Unterschiede zwischen den Füllstoffen in Abb. 2 (oben und Mitte) können deshalb nicht allein durch hydrolytischen Molmassenabbau erklärt werden. Ein Einfluss der Spritzgießbedingungen auf die Abnahme der Molmasse bei Einlagerung ist nicht feststellbar.

In allen PEEK-Kompositen (nicht dargestellt) blieb die Wasseraufnahme unter 0,6 %, und es war keine Massenänderung durch Abbau nachweisbar. Auch hier zeigte sich kein Einfluss der Prozessbedingungen auf die Wasseraufnahme oder den Abbau der Probekörper.

Einfluss der Einlagerung in physiologischer Lösung auf die antibakterielle Wirksamkeit und die mechanischen Eigenschaften

Zur Untersuchung des Einflusses der Spritzgießbedingungen und Einlagerungszeit auf die antibakterielle Wirksamkeit der mit ZnO-gefüllten PLA- und PEEK-Komposite wurden für die jeweiligen Polymer/Füllstoffkombinationen Probekörper mit verschiedenen Spritzgießparameter-Sätzen hergestellt, wie oben beschrieben vorkonditioniert, in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei 37 °C eingelagert und nach der Entnahme mittels des CFU-Testes untersucht.

Die antibakteriellen Wirksamkeiten der mit ZnO gefüllten und vorbehandelten PLA-Probekörper sind in Abb. 3 in Abhängigkeit von der Einlagerungszeit für Proben mit 30 % TCP (geschlossene Symbole) und ohne TCP (offene Symbole) dargestellt. In der

halblogarithmischen Darstellung ist der als antibakteriell wirksam angenommene Bereich ($< 0,1$ % der *E. Coli* Bakterien überleben) grau unterlegt.

Wie bereits bei der Wasseraufnahme und beim Abbau gruppieren sich die zeitabhängigen antibakteriellen Wirksamkeiten nach den Zusammensetzungen der TCP/ZnO-Komposite, wogegen die unterschiedlichen Prozessbedingungen (dargestellt durch verschiedene Symbole) keinen Einfluss auf die zeitliche Entwicklung der antibakteriellen Wirksamkeit zeigen.

Die Proben mit 30 % TCP und 3 % ZnO verlieren nach etwa 2 Monaten Einlagerung in PBS ihre antibakterielle Wirksamkeit, wogegen die Proben ohne TCP und 3 % ZnO im untersuchten Zeitraum von 268 Tagen antibakteriell wirksam blieben.

Die Probekörper aus PEEK-Kompositen mit 10 % ZnO (Abb. 3 rechts) zeigten unabhängig vom HAP-Gehalt – mit einigen Ausreißern – eine Wirksamkeit bis zu mindestens 268 Tagen. Der Mechanismus der Wirkstofffreisetzung in den PEEK- und PLA-Kompositen bedarf weiterer Untersuchungen. Die unterschiedlichen Prozessbedingungen (dargestellt durch verschiedene Symbole) zeigten wiederum keinen Einfluss auf die antibakterielle Wirksamkeit.

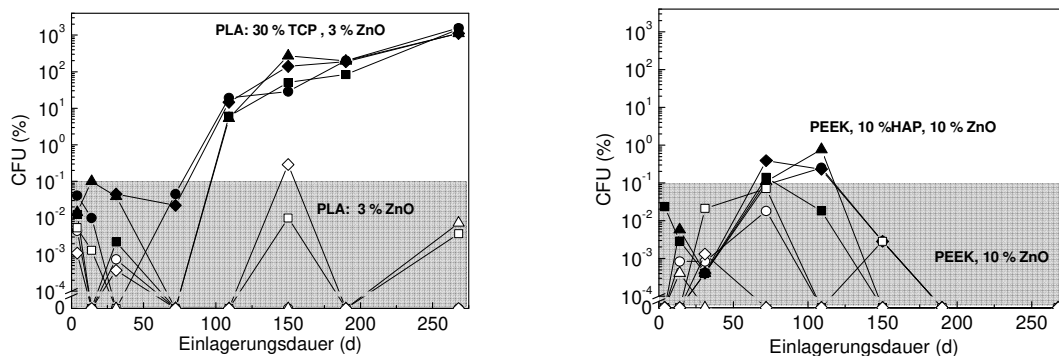


Abb. 3: Durch CFU-Test ermittelte antibakterielle Wirksamkeit von Probekörpern aus PLA/ZnO- (links) und PEEK/ZnO-Kompositen (rechts) ohne Füllstoff (offene Symbole) und mit 30 % TCP bzw. 10 % HAP (gefüllte Symbole) als Funktion der Einlagerungszeit in PBS bei 37 °C. Die verschiedenen Symbole kennzeichnen die Spritzgießbedingungen für die PLA- (siehe Legende in Abb. 2) und PEEK-Komposite (Kreise: $T_W = 180$ °C, $T_S = 370$ °C, $t = 2,12$ s, Quadrate: $T_W = 200$ °C, $T_S = 370$ °C, $t = 2,12$ s, Dreiecke: $T_W = 180$ °C, $T_S = 390$ °C, $t = 2,12$ s, Rauten: $T_W = 180$ °C, $T_S = 370$ °C, $t = 0,59$ s)

Die mechanischen Eigenschaften der Prüfkörper aus PLA 3001D, wie Elastizitätsmodul, Bruchspannung, Bruchdehnung oder Schlagzähigkeit zeigen ein unterschiedliches Zeitverhalten bei Einlagerung in PBS. Die Schlagzähigkeit (nicht dargestellt) zeigt im Rahmen der sehr großen Fehler keine signifikanten Änderungen. Der Elastizitätsmodul (Abb. 4, links) nimmt für alle PLA-Komposite zunächst zu, um mit längerer

Einlagerungsdauer deutlich abzufallen. Die Unterschiede in den Absolutwerten ergeben sich aus den unterschiedlichen Füllstoffen und deren Anteilen. Die Bruchspannung (Abb. 4, Mitte) zeigt einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie der Elastizitätsmodul, wobei die Zugabe des TCP zu einer deutlichen Verringerung der Bruchspannung führt. Dies gilt auch für die Bruchdehnung, die mit der Einlagerungszeit stetig abnimmt (Abb. 4, rechts).

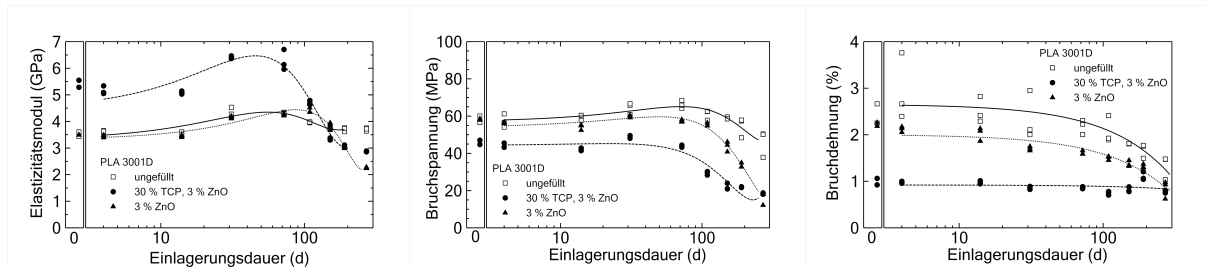


Abb. 4: Elastizitätsmodul (links), Bruchspannung (Mitte) und Bruchdehnung (rechts) von PLA ohne Füll- und Wirkstoff (Quadrate), PLA mit 3 % ZnO (Dreiecke) und PLA mit ZnO und TCP (Kreise) als Funktion der Einlagerungszeit in PBS bei 37 °C. Spritzgießbedingungen: $T_{W1} = 45$ °C, $T_{S1} = 175$ °C, $t = 0,55$ s.

Für einen schnellen Abbau des PLA ist das TCP jedoch erforderlich, da in Kompositen mit TCP in kürzerer Zeit eine höhere Wassermenge aufgenommen wird, als dies mit ZnO alleine der Fall ist.

PLA-Proben ohne TCP und die PEEK-Proben zeigten im betrachteten Zeitraum keinen oder einen nur sehr geringen Abbau. Die Abhängigkeit von den Spritzgießparametern ist ebenfalls gering. Dies gilt auch für die untersuchten mechanischen Eigenschaften wie Elastizitätsmodul, Bruchspannung, Bruchdehnung oder Schlagzähigkeit.

Zusammenfassung

Komposite aus PLA bzw. PEEK lassen sich mit Zinkoxid (ZnO) als Wirkstoff antibakteriell ausrüsten. PEEK/ZnO-Komposite und PLA/ZnO-Komposite ohne Tricalciumphosphat (TCP) zeigen bei Einlagerung in phosphatgepufferter physiologischer Lösung (PBS) bei 37 °C über einen Zeitraum von mindestens 9 Monaten eine antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *E. coli*. Die Zugabe von 30 % Tricalciumphosphat zum PLA/ZnO-Komposit führt zu einer Verkürzung der bakteriziden Wirkung. Eine puffernde Wirkung des TCP auf den pH-Wert konnte nicht beobachtet werden. Um eine antibakterielle Wirkung des ZnO zu erzielen, war eine Oberflächenvorbehandlung der spritzgegossenen Probekörper erforderlich. Für PLA-Komposite erfolgte eine Einlagerung für 72 h in Wasser bei 45 °C. Die PEEK-Prüfkörper wurden für 5 Minuten in Luftplasma geätzt.

Die Molmasse des PLA nimmt unabhängig von der Anwesenheit der Füll- oder Wirkstoffe mit der Einlagerungszeit in PBS ab. PLA ohne TCP zeigt im untersuchten Zeitraum nur eine geringe Massenänderung in PBS, wogegen die Zugabe von TCP den Masseabbau deutlich beschleunigt. Die PLA-Komposite mit Tricalciumphosphat nehmen in kürzerer Zeit eine höhere Wassermenge auf als die Komposite, die nur ZnO enthalten. Es wird vermutet, dass Tricalciumphosphat das Auswaschen befördert und ggf. die Hydrolyse beschleunigt. Das Tricalciumphosphat führt jedoch zu einer signifikanten Versprödung der spritzgegossenen Proben: Bruchspannung und Bruchdehnung steigen an, und der E-Modul nimmt ebenfalls zu.

Bei Einlagerung in PBS steigt der E-Modul bis ca. 70 Tage an, um danach unter das Ausgangsniveau zu fallen. Die Bruchspannung zeigt einen ähnlichen Zeitverlauf und die Bruchdehnung nimmt stetig ab. Bei Anwesenheit von Phosphat (aus TCP oder PBS) wurde die Bildung von Scholzitkristallen während der Einlagerung beobachtet. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig.

Die Prozessbedingungen beim Spritzguss (Schmelzetemperatur, Temperatur des Spritzgusswerkzeugs und Einspritzdauer) zeigten sowohl für die PLA- als auch für die PEEK-Komposite nur einen geringen Einfluss auf die Kristallinität, die mechanischen Eigenschaften und die antibakterielle Wirksamkeit. Entsprechend gering war - entgegen der Arbeitshypothese - der Einfluss der Prozessvorgeschichte (Compoundieren und Spritzguss) auf den Molmassenabbau, den Gewichtsverlust und die Wasseraufnahmefähigkeit sowie die antibakterielle Wirksamkeit während der Einlagerung in physiologischer Lösung.

Danksagung

Das IGF-Vorhaben 19019 BG der Forschungsvereinigung Forschungsgesellschaft Kunststoffe e.V. (FGK) wurde über die



im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:



**aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages**

Für diese Förderung sei gedankt.

Ebenso gilt der Dank der Forschungsgesellschaft Kunststoffe e.V.

Weiterhin danken wir den im projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Unternehmen für ihre fachliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Herrn Alexander Woyk für konstruktive Diskussionen und die Durchführung kalorimetrischer und mechanischer Analysen.