

**Diana C. Martinez G., M.Sc.**

**Mg-based bioabsorbable implants: From surface characterization to tissue-implant interface evaluation after *in vitro* and *in vivo* degradation**

**ABSTRACT**

Bone fractures are a global public health concern, with an annual incidence of over 179 million new fractures. A large number of these bone fractures are treated with internal fixation implants, which are preferred among young and elderly patients. Most fracture-fixing implants are permanent and made of cobalt alloys, stainless steel, titanium, and its alloys. These materials are chosen due to their high mechanical strength, corrosion resistance, and proven biocompatibility. However, after the fracture has healed, a secondary surgical procedure is required to remove the implants. This increases discomfort for patients and healthcare costs, in addition to possible complications such as interference with skeletal growth in children, the stress shielding effect, and foreign body reactions.

To overcome these disadvantages, absorbable metals such as magnesium (Mg) and its alloys have recently gained attention for their use in the orthopedic field. These absorbable metals are considered an alternative for internal fixation implants because they possess mechanical properties close to human cortical bone. Nevertheless, the unpredictable corrosion rate of Mg-based devices, which could compromise their mechanical stability before fracture repair, has restricted their wide clinical use.

Therefore, this doctoral thesis seeks to gather information using high-resolution imaging techniques on Mg-based specimens, focusing on understanding the bone-implant interface's composition, structure, topography, and properties through *in vitro* and *in vivo* investigations. The goal is *to gain an insight into the corrosion mechanisms that take place throughout the degradation of Mg-based implants.*

To accomplish the overall objective of this thesis and validate the following hypothesis: i) The composition of the corrosion layer on Mg-based materials is significantly affected by cell viability, proliferation, and cell adhesion under *in vitro* conditions, and ii) The composition of corrosion layers on implants varies according to their *in vivo* location, the research approaches were divided into three subprojects, each with its specific objectives:

**Objective 1:** Provide a baseline information of the as received Mg-based implants;

The surface properties and microstructure of the as-received Mg-implants were characterized by the importance of the surface integrating with the surrounding tissues and evaluating the influence of the manufacturing methods on the corrosion resistance of these medical implants.

**Objective 2:** Determine the corrosion rate of Mg-based devices without and with the presence of osteoblast (OB) and osteoclast (OC) cells. Additionally, analyze the kinetic changes in the composition of the degradation products as the corrosion of the Mg materials proceeds.

By performing *in vitro* tests under physiological conditions, the impact of the Mg degradation on pH and osmolality changes in the surrounding *in vitro* environment was investigated. Similarly, the Mg-cell interface was analyzed to evaluate the extent to which bone cells influence the corrosion behavior of Mg implants and their corrosion layers' composition.

**Objective 3:** Characterize the corrosion layers formed at the implant-tissue interfaces when using Mg-based devices from *in vivo* research to assess the corrosion performance in various tissue compartments.

This section of the thesis focuses on analyzing retrieved implants from small and large animal studies. The aim was to investigate the dynamic changes that occurred in the protective corrosion layers as the Mg implants degraded. Additionally, the research seeks to understand the dynamic and highly complex interface changes, which are crucial for bone ingrowth and remodeling.

In conclusion, the multimodal approach to the study of the Mg implants demonstrated that the investigated Mg medical implants meet the threshold necessary for biodegradable implants to have an appropriate lifespan, with corrosion rates *in vivo* below 0.5 mm/year. The Mg implants exhibited smooth, anisotropic, and free of contaminant surfaces as received, highlighting the importance of proper cleaning, sterilization, packaging, and storage to maintain the surface qualities of the Mg implants for therapeutic purposes. In addition, the corrosion products that formed *in vitro* exhibited a similar elemental composition (including O, Mg, P, and Ca) to what was observed *in vivo*. However, the thickness of the corrosion layer and the distribution of elements were Mg-substrate dependent, varied in the presence of OB and OC cells, and were implantation site dependent. This emphasizes the significance of comprehending the factors that contribute to the discrepancy between the *in vitro* and *in vivo* corrosion rates. The multicellular and multimodal *in vitro* model aims to mimic the outcomes from *in vivo* research while minimizing the need for animal testing. However, for biological relevance, animal studies are still required not only to obtain regulatory approval for medical use but also to provide insights into

the behavior of the Mg material within physiological environments and the tissue response as the Mg material degrades.

**Keywords:** Magnesium alloys, absorbable metals, orthopedic implants, implant-tissue interface, corrosion behavior, osteoblasts (OB), osteoclasts (OC), *in vitro*, *in vivo*.

## STRESZCZENIE

Złamania kości są globalnym problemem zdrowia publicznego, z roczną częstością występowania ponad 179 milionów nowych złamań. Duża liczba tych złamań kości jest leczona za pomocą implantów do stabilizacji wewnętrznej, które są preferowane wśród młodych i starszych pacjentów. Większość implantów mocujących złamania jest trwała i wykonana ze stopów kobaltu, stali nierdzewnej, tytanu i jego stopów. Materiały te są wybierane ze względu na ich wysoką wytrzymałość mechaniczną, odporność na korozję i sprawdzoną biokompatybilność. Jednak po zagojeniu się złamania wymagana jest dodatkowa procedura chirurgiczna w celu usunięcia implantów. Zwiększa to dyskomfort pacjentów i koszty opieki zdrowotnej, a także możliwe powikłania, takie jak zakłócenie wzrostu szkieletu u dzieci, efekt ekranowania naprężeń i reakcje na ciała obce.

Aby przezwyciężyć te wady, wchłanialne metale, takie jak magnez (Mg) i jego stopy, zyskały ostatnio uwagę ze względu na ich zastosowanie w dziedzinie ortopedii. Te absorbowalne metale są uważane za alternatywę dla wewnętrznych implantów mocujących, ponieważ posiadają właściwości mechaniczne zbliżone do ludzkiej kości korowej. Niemniej jednak, dużym ograniczeniem stosowania Mg i jego stopów na implanty jest ich nieprzewidywalna szybkość korozji, poprzez co, implant może utracić stabilność mechaniczną.

W związku z tym niniejsza praca doktorska ma na celu zebranie kompleksowych informacji na temat zachowania się Mg i jego stopów w trakcie implantacji przy użyciu technik obrazowania o wysokiej rozdzielczości. Nacisk kładziony jest na zrozumienie składu i struktury produktów korozji, topografii i właściwości interfejsu kość-implant po badaniach *in vitro* i *in vivo*. *Celem jest uzyskanie wiedzy o mechanizmach korozyjnych zachodzących podczas degradacji implantów na bazie Mg.*

Aby osiągnąć główny cel niniejszej rozprawy i zweryfikować następujące hipotezy: i) Na skład warstwy korozyjnej na materiałach na bazie Mg znacząco wpływa obecność komórek, proliferacja i adhezja komórek w warunkach *in vitro*, oraz ii) Skład warstw korozyjnych na implantach różni się w zależności od ich lokalizacji *in vivo*, podejścia badawcze zostały podzielone na trzy części, dla których określono następujące cele badawcze:

**Cel 1:** Dostarczenie podstawowych informacji o badanych implantach na bazie Mg.

Właściwości powierzchni i mikrostruktura badanych implantów magnezowych zostały scharakteryzowane pod kątem znaczenia integracji powierzchni z otaczającymi tkankami oraz oceny wpływu metod produkcji na odporność tych implantów na korozję.

**Cel 2:** Określenie szybkości korozji implantów na bazie Mg bez i z obecnością komórek osteoblastów (OB) i osteoklastów (OC). Analiza zmian kinetycznych w składzie produktów degradacji w miarę postępu korozji materiału Mg;

Przeprowadzając testy *in vitro* w warunkach fizjologicznych, zbadano wpływ degradacji Mg na zmiany pH i osmolalności w otaczającym środowisku *in vitro*. Podobnie przeanalizowano interfejs Mg-komórka, aby ocenić zakres, w jakim komórki kostne wpływają na zachowanie korozyjne implantów Mg i ich skład warstw korozyjnych.

**Cel 3:** Scharakteryzowanie interfejsu tkanka-warstwa korozyjna-implant Mg przy użyciu badań *in vivo* w celu oceny działania korozyjnego w różnych obszarach tkankowych.

Ta część rozprawy koncentruje się na analizie odzyskanych implantów z badań na małych i dużych zwierzętach. Celem było zbadanie dynamicznych zmian zachodzących w warstwach korozyjnych w trakcie degradacji implantów Mg. Ponadto badania mają na celu zrozumienie dynamicznych i wysoce złożonych zmian interfejsu, które są kluczowe dla wrastania i przebudowy kości.

Podsumowując, kompleksowe podejście do badania implantów Mg wykazało, że badane implanty Mg spełniają wymagania niezbędne dla biodegradowalnych implantów; posiadają odpowiednią żywotność, oraz szybkość korozji *in vivo* poniżej 0,5 mm/rok. Implanty Mg wykazywały gładkie, anizotropowe i wolne od zanieczyszczeń powierzchnie, co podkreśla znaczenie właściwego czyszczenia, sterylizacji, pakowania i przechowywania w celu utrzymania jakości powierzchni implantów Mg do celów terapeutycznych. Produkty korozji, które powstały *in vitro*, wykazywały podobny skład chemiczny (w tym O, Mg, P i Ca) do składu produktów powstałych w trakcie badań *in vivo*. Grubość warstwy korozyjnej i rozkład pierwiastków były zależne od podłoża Mg, różniły się w zależności od obecności komórek OB i OC oraz były zależne od miejsca implantacji. Podkreśla to znaczenie zrozumienia czynników, które przyczyniają się do rozbieżności między szybkością korozji *in vitro* i *in vivo*. Wielokomórkowy i kompleksowy model *in vitro* ma na celu naśladowanie wyników badań *in vivo* przy jednoczesnym zminimalizowaniu potrzeby przeprowadzania testów na zwierzętach. Jednak ze względu na znaczenie biologiczne, badania na zwierzętach są nadal wymagane nie tylko w celu uzyskania zgody organów regulacyjnych na zastosowanie implantów, ale także w celu zapewnienia wglądu w zachowanie Mg w środowisku fizjologicznym i reakcję tkanki, gdy materiał ulega degradacji.

**Słowa kluczowe:** Stopy magnezu, metale biodegradowalne, implanty ortopedyczne, interfejs implant-tkanka, zachowanie korozyjne, osteoblasty (OB), osteoklasty (OC), *in vitro*, *in vivo*.

**Supervisor**

Professor Wojciech Świążkowski, Ph.D.,

**Co-supervisor**

Tomasz Płociński, Ph.D.,