

Bioprinting Technologies for Auricular Cartilage Tissue Engineering

Doctoral Thesis

Author(s):

Kesti, Matti

Publication date:

2018

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000280389>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 24889

Bioprinting technologies for auricular cartilage tissue engineering

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
MATTI JAAKKO JOHANNES KESTI
MSc in Materials engineering, TUT

born on 15.12.1987
Finland

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Marcy Zenobi-Wong, examiner
Prof. Dr. Dominique Pioletti, co-examiner
Prof. MD. Nicole Rotter, co-examiner

2018

ABSTRACT

Bioprinting technologies are based on layer-by-layer assembly of living cells and biomaterials to manufacture three-dimensional (3D) biological structures. These structures can be designed based on clinical 3D models of individual patients to produce personalized tissue grafts. External ear reconstruction is one such clinical application that could be significantly improved with bioprinted personalized grafts. Each person has unique ears and the lack of this aesthetic feature can subject patients to psychosocial problems throughout their lives. A rare congenital disease called microtia affects 1 in 3,800 newborn babies and is characterized with a deformity of the external ear. The current standard of care for young microtia patients is autologous costal cartilage grafting based on the harvesting of several ribs to build an ear template. Several surgeries are required to reconstruct the external ear and a steep learning curve for surgeons limits the number of surgical experts around the world that can perform these procedures. Patients often experience high donor site pain from the rib harvest and the patient-reported outcome is often poor due to the low aesthetic outcome of the reconstruction. In the future, tissue engineering might offer a solution for these children where only a small autologous cartilage biopsy is required to fully reconstruct the ear cartilage. Such approaches have been extensively investigated in the last decade to overcome the need for costal cartilage harvest and to improve the aesthetic outcome of the reconstruction.

In this thesis a series of new bioprinting concepts were investigated while refining a biomaterial composition that was suitable for chondrocyte encapsulation, commonly referred as a “bioink”. The bioink developed in this work consists of gellan gum and alginate biopolymers that will undergo simultaneous physical gelation in the presence of divalent cations. This bioink with cell friendly crosslinking process could be applicable for the production of cellular cartilage-like grafts. To demonstrate this capability and suitability for the bioprinting processes, a proof-of-concept study was performed to bioprint several large cartilage-specific tissue grafts including ear, nose, meniscus and intervertebral disc with the bioink. The bioink was demonstrated to produce cartilage specific extracellular matrix *in vitro* with supplementation of transforming growth factor in the cell culture medium. To further demonstrate the clinical applicability of the bioink, we performed two consecutive preclinical studies with duration up to 16 weeks. These studies investigated different bioink compositions and crosslinking conditions and their influence on human chondrocytes from healthy and microtia samples. Despite the used cell source or the bioink composition the grafts were observed to adopt cartilage-like appearance and significant improvement in biomechanical properties of the grafts were observed over the study duration in all cellular compositions. These findings supported the hypothesis that this bioink can support chondrocyte proliferation and extracellular matrix deposition *in vivo*. This was proven with histological stainings of typical cartilage specific components such as glycosaminoglycans and collagen type II. The bioink grafts had developed a rich cartilage-specific extracellular matrix after 8 weeks *in vivo*. Similarly, the bioink grafts after 16 weeks were positively stained with cartilage-specific histological stainings. No adverse effects such as graft rejections or wound infections were observed in the immunocompromised nude mouse model up to 16 weeks.

The large hydrogel-based structures often possess limited mechanical properties rendering them unsuitable for handling and insufficient to withstand physiological loading at the implantation site. To overcome this common limitation of hydrogels, we developed a bioprinted reinforcement technology to improve the achieved mechanical properties within the composite hydrogel grafts. This reinforcement ink was co-extruded with the bioink to produce composite grafts with unisotropic mechanical properties. In contrast to commonly used thermoplastic polymer based reinforcements,

this hydrogel-based reinforcement can directly bind to the bioink thus improving the synergistic mechanical properties of the composite and preserving the graft flexibility. Unisotropic and flexible composites can be desired in special applications such as the external ear to mimic the natural elastic cartilage-like properties and flexibility of the auricular cartilage. The biocompatibility of the reinforced bioink composite grafts was compared to the bioink grafts in vivo up to 8 weeks where the bioink comprised of healthy human auricular chondrocytes in both graft types. No distinct differences were histologically observed while a cartilage-specific extracellular matrix deposition was observed from histological stainings. Interestingly the reinforced bioink composite grafts had significantly improved mechanical properties after in vivo implantation in comparison to the bioink graft. Based on these promising preclinical studies, the reinforcement ink could be applied to several bioprinting applications to improve the mechanical properties of the hydrogel grafts without compromising the high bioink biocompatibility.

Bioprinting has evolved to be considered a manufacturing technology suitable for production of cell based therapy products. However, in order to manufacture clinical tissue grafts, the bioprinting process parameters must be better understood and standardized. During these studies, we published several printing parameter influential for reproducible bioprinting and introduced the first printing guidelines. Such standards and guidelines aid in enabling the translation of bioprinting technologies from research processes to industrial manufacturing technologies. After achieving the industrial manufacturing standards, the bioprinting technologies could be used to produce clinically applicable patient-specific grafts. The introduced bioink, containing autologous chondrocytes from the patient's ear, could be used in the bioprinting process to manufacture auricular cartilage grafts based on the patient's contralateral ear shape. In the future, this approach could be realized to produce customized ear reconstruction for microtia patients.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bioprintingtechnologie basiert auf einer schichtweisen Anordnung von lebenden Zellen und Biomaterialien, sogenannten Bioinks, in engen räumlichen, dreidimensionalen (3D) Strukturen. Diese Strukturen können auf der Grundlage von klinischen 3D-Modellen individueller Patienten gefertigt werden, um Gewebetransplantate für personalisierte klinische Produkte herzustellen. Eine solche klinische Anwendung, die mit biogedruckten personalisierten Ohrtransplantaten signifikant verbessert werden könnte, wäre die Rekonstruktion des äusseren Ohres. Jede Person hat einzigartige Ohren und ein Defekt dieses ästhetischen Merkmales kann bei Patienten zu lebenslangen psychosozialen Problemen führen. Mikrotie ist eine seltene angeborene Erkrankung welche einen von 3.800 Neugeborenen betrifft und zu einer Missbildung des äusseren Ohres führt. Der derzeitige Behandlungsstandard junger Mikrotie-patienten ist die autologe Rippentransplantation wobei mehrere Rippen entnommen und daraus eine Ohrmuschel gefertigt wird. Mehrere Operationen sind erforderlich, um das gesamte Ohr zu rekonstruieren und eine steile Lernkurve begrenzt die weltweite Zahl chirurgischer Experten die das Verfahren durchführen können. Die Patienten leiden häufig an starken Schmerzen an der Rippenentnahmestelle was zusammen mit den mangelhaften ästhetischen Ergebnissen der Rekonstruktion zu einem schlechten Patient Reported Outcome führt. Für diese Kinder könnte in der Zukunft Tissue Engineering eine Lösung bieten, bei welcher nur eine kleine autologe Knorpelbiopsie erforderlich wäre um den Ohrknorpel vollständig zu rekonstruieren. Solche Ansätze wurden in den letzten zehn Jahren intensiv untersucht um eine Rippenentnahme zu vermeiden und das ästhetische Ergebnis der Rekonstruktion zu verbessern.

In dieser Arbeit wurde eine Reihe neuer Bioprinting-Konzepte erforscht, wobei eine für die Chondrozyteineinbettung geeignete Bioink verbessert wurde und die Formtreue und Reproduzierbarkeit des Bioprintings verbessert wurden. Dieses Bioink könnte für die Herstellung von autologen Knorpeltransplantaten zur Knorpelrekonstruktion verwendet werden. Um diese Fähigkeiten zu demonstrieren wurde eine Proof-of-Concept-Studie durchgeführt, wobei mehrere Knorpel-Gewebetransplantate - ein Ohr, eine Nase, ein Meniskus und eine Bandscheibe - in Originagrösse gedruckt wurden. Des Weiteren wurde in diesem Projekt eine der ersten vollständig hydrogelbasierten Verstärkungstechnologien entwickelt um die begrenzten mechanischen Eigenschaften der Hydrogele durch Bioprinting von Verbundtransplantaten mit zellulären Biomaterialien zu verbessern. Menschliche aurikuläre Chondrozyten wurden mit oder ohne Verstärkung in diese Bioink eingebettet um Gewebetransplantate herzustellen, welche anschließend in einem in vivo Mausmodell getestet wurden. Die Bioink-Transplantate nahmen ein knorpel-ähnliches Aussehen an und die gezeigte Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften deutet auf das Potential der Bioink bei der Unterstützung der Chondrozytenproliferation und der extrazellulären Matrixabscheidung in vivo hin. Bereits 8 Wochen nach der Implantation waren die Bioink-Transplantate reich an knorpelspezifischer extrazellulärer Matrix bestehend aus Glycosaminoglycanen und Kollagen Typ II. Im Mausmodell mit immundefizienten Mäusen konnten während 16 Wochen nach der Implantation keine nachteiligen Effekte beobachtet werden. Die produzierten Bioink-Strukturen zeigten keine Volumenveränderung und unterstützten die Akkumulation von Knorpelmatrixproteinen. Drei aufeinanderfolgende präklinische Tierversuche wurden durchgeführt um verschiedene Bioinkkompositionen und Vernetzungsbedingungen mit menschlichen mikrotischen sowie gesunden Chondrozyten zu untersuchen. Basierend auf diesen vielversprechenden präklinischen Studien wurde ein Satz von biogedruckten Ohrtransplantate in Originalgrösse produziert um die kostale Rippenknorpelschablone, welche in Mikrotie-Rekonstruktionen verwendet wird, zu imitieren. Die entwickelte Bioprinting-Technologie wäre eine optimale Methode zur Herstellung von komplexen Ohrtransplantaten. Um jedoch klinische Gewebetransplantate herzustellen müssen die Parameter des Bioprinting-Verfahrens

besser verstanden und standardisiert werden. Während diesen Studien veröffentlichten wir mehrere Druckparameter-Tests und schlugen die ersten Bioprinting-Richtlinien für das Feld vor. Solche Normen und Richtlinien helfen bei der Übertragung der Bioprintingtechnologie aus der Forschung in die industrielle Fertigung. Sobald die industriellen Fertigungsstandards erfüllt werden, könnte die Bioprintingtechnologie zur Herstellung von klinisch anwendbaren patientenspezifischen Ohrtransplantaten, welche nach der kontralateralen Ohrform modelliert werden, verwendet werden. Dieser Ansatz könnte möglicherweise in Zukunft verwendet werden, um maßgeschneiderte aurikuläre Knorpeltransplantate zur Behandlung von Mikrotie-Patienten zu produzieren.