



Cyprus
University of
Technology

FACULTY OF
ENGINEERING AND
TECHNOLOGY

Master's Thesis

**CHARACTERIZATION OF STEM CELL-DERIVED VESICLES FOR DRUG
DELIVERY**

Maria Koulenti

Limassol, May 2018

ABSTRACT

Cancer is among the *leading causes of death* worldwide. Uncontrollable or abnormal cell proliferation is one of the main characteristics of cancer, leading to tumor formation. Conventional cancer therapies not only affect the cancer cells but also influence the healthy cells. Thus, the development of more efficient drug delivery systems for targeted cancer therapy will overcome the consequences of current treatments, by destroying only the malignant cells.

This study concerns the Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell (WJMSC)-derived vesicles as drug delivery systems, due to their unique properties such as selectively homing in sites of inflammation and tumors and selectively delivering of therapeutic miRNAs to target cells, and thus regulate targeted gene expression and cellular function. The aim of the study is to characterize the WJMSC-derived vesicles (*Extracellular vesicles*: particles including exosomes (<100nm) and *Microparticles*: (0.1µm-1µm)), elucidating their precise size and concentration, in order to be used for future *in vitro* and *in vivo* studies.

MSC-derived vesicles were separated in size groups via Exclusion Chromatography Separation qEV columns, in order to check in subsequent studies whether an infiltration will selectively occur in an organ and to check, what the size range of the vesicles that influence this infiltration, will be. Although, the small size and the heterogeneity in size and composition of these vesicles make their quantification challenging, samples and fractions of these vesicles were characterized, in terms of size and concentration, via Tunable Resistive Pulse Particle (TRPS) analysis. Concentration measurements of vesicles are crucial, in order to check in subsequent studies which vesicles' concentration will result in the successful reduction of the cancer tumors. Furthermore, samples and fractions of the vesicles were analyzed via Scanning Electron Microscopy (SEM), in order to verify the presence of vesicles in the samples and to check their morphology and size, in order to validate the results of TRPS analysis. Finally, the samples and fractions were analyzed, in terms of protein, RNA, miRNA concentration using Spectrophotometer, in order to check whether measured vesicles were active and biological vesicles and not fragments of inorganic material.

The results based on TRPS analysis indicated that the size separation using qEV size exclusion columns did not separate these vesicles in size groups, under specific conditions. SEM analysis in the fractions showed large multi-shaped particulates with crystal structures, which they had a distinctly different appearance from biological particles, compared to the vesicles that were found in the samples, in which the separation method was not applied. Protein, RNA and miRNA analysis showed very small concentrations of protein, RNA and miRNA in the fractions, suggesting non biological particles or very low vesicle concentration, compared to the high concentration in the samples, in which the separation method was not applied. The qNano instrument achieved successful measurements of the size and concentration of the vesicles, showing good repeatability.

The particle-by-particle measurement of the size and concentration of the WJMSC-derived vesicles was achieved; however the separation and characterization methods need to be standardized and validated, in order to have accurate and validated results when these measurements will be applied for preclinical and clinical use.

Keywords: TRPS, qNano, Size Exclusion Chromatography, Mesenchymal Stem Cells, Wharton's jelly, Extracellular Vesicles, Microparticles

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Ο ανεξέλεγκτος ή μη φυσιολογικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του καρκίνου, το οποίο οδηγεί σε σχηματισμό όγκων. Οι συμβατικές θεραπείες καρκίνου δεν επηρεάζουν μόνο τα καρκινικά κύτταρα, αλλά επηρεάζουν επίσης και τα υγιή κύτταρα. Έτσι, η ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών συστημάτων χορήγησης φαρμάκων για τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου θα ξεπεράσει τις συνέπειες των συμβατικών θεραπειών, καταστρέφοντας μόνο τα κακοήθη κύτταρα.

Η συγκεκριμένη μελέτη αφορά τα κυστίδια που προέρχονται από τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα τη γέλης Wharton, ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους, όπως η επιλεκτική προσέλκυση σε περιοχές φλεγμονής και όγκων και η επιλεκτική μεταφορά θεραπευτικών miRNAs σε κύτταρα-στόχους, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση του στοχευμένου γονιδίου και την κυτταρική λειτουργία. Ο σκοπός της μελέτης είναι να χαρακτηριστούν τα κυστίδια που προέρχονται από τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα τη γέλης Wharton (Εξωκυτταρικά κυστίδια: σωματίδια συμπεριλαμβανομένων εξωσωμάτων (<100nm) και Μικροσωματίδια: (0,1μm-1μm)), διευκρινίζοντας το ακριβές τους μέγεθος και συγκέντρωση, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για *in vitro* και *in vivo* μελέτες.

Αυτά τα κυστίδια διαχωρίστηκαν σε ομάδες αναλόγα με το μέγεθος μέσω της μεθόδου των qEV στηλών χρωματογραφίας διαχωρισμού μεγέθους, προκειμένου να ελεγχθεί σε επακόλουθες μελέτες αν τα κυστίδια θα καταλήξουν επιλεκτικά σε ένα όργανο και να ελεγχθεί ποιο είναι το εύρος μεγέθους των κυστιδίων που το επηρεάζει. Αν και το μικρό μέγεθος και η ετερογένεια στο μέγεθος και τη σύνθεση τους καθιστούν την ποσοτικοποίησή τους δύσκολη, τα δείγματα και τα φιαλίδια των κυστιδίων αυτών χαρακτηρίστηκαν, ως προς το μέγεθος και τη συγκέντρωση, μέσω της ανάλυσης ρυθμιζόμενης ανίχνευσης παλμών αντιστάσης (TRPS). Οι μετρήσεις στη συγκέντρωση των κυστιδίων είναι κρίσιμης σημασίας, προκειμένου να ελεγχθεί σε μετέπειτα μελέτες η συγκέντρωσή τους που θα οδηγήσει στην επιτυχή μείωση των καρκινικών όγκων. Επιπλέον, τα δείγματα και τα φιαλίδια των κυστιδίων αναλύθηκαν μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, προκειμένου να επαληθευτεί η ύπαρξή τους στα

δείγματα και να ελεγχθεί η μορφολογία και το μέγεθος τους, ώστε να επικυρωθούν τα αποτελέσματα της ανάλυσης TRPS. Τέλος, τα δείγματα και τα φιαλίδια των κυστιδίων αναλύθηκαν, όσον αφορά τη συγκέντρωση πρωτεΐνης, RNA και miRNA χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο, προκειμένου να ελεγχθεί εάν τα κυστίδια που εξετάστηκαν ήταν ενεργά και βιολογικά κυστίδια και όχι θραύσματα ανόργανου υλικού.

Τα αποτελέσματα με βάση την ανάλυση TRPS έδειξαν ότι ο διαχωρισμός μεγέθους χρησιμοποιώντας στήλες qEV δεν διαχώρισε τα κυστίδια σε ομάδες μεγέθους, κάτω από ειδικές συνθήκες. Η ανάλυση SEM των φιαλιδίων έδειξε μεγάλα σωματίδια πολλαπλών σχημάτων με κρυσταλλικές δομές, τα οποία είχαν σαφώς διαφορετική εμφάνιση από τα βιολογικά σωματίδια, σε σύγκριση με τα κυστίδια που βρέθηκαν στα δείγματα, στα οποία δεν εφαρμόστηκε η μέθοδος διαχωρισμού. Η ανάλυση σχετικά με την πρωτεΐνη, το RNA και το miRNA έδειξε πολύ μικρές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, RNA και miRNA στα φιαλίδια, υποδηλώνοντας μη βιολογικά σωματίδια ή πολύ χαμηλή συγκέντρωση κυστιδίων, σε σύγκριση με τις υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα, στα οποία δεν εφαρμόστηκε η μέθοδος διαχωρισμού. Το όργανο qNano πέτυχε επιτυχείς μετρήσεις του μεγέθους και της συγκέντρωσης των κυστιδίων, παρουσιάζοντας καλή επαναληψιμότητα.

Η μέτρηση του μεγέθους και της συγκέντρωσης των κυστιδίων επιτεύχθηκε σωματίδιο ανά σωματίδιο. Ωστόσο, οι μέθοδοι διαχωρισμού και χαρακτηρισμού πρέπει να τυποποιηθούν και να επικυρωθούν, προκειμένου να υπάρξουν ακριβή και επικυρωμένα αποτελέσματα όταν οι μετρήσεις αυτές θα εφαρμοστούν για προκλινική και κλινική χρήση.

Λέξεις-κλειδιά: TRPS, qNano, Χρωματογραφία διαχωρισμού μεγέθους, Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, Γέλη Wharton, Εξωκυτταρικά κυστίδια, Μικροσωματίδια