



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Extracellular vesicle therapeutics for cardiac repair: A translational perspective

Mol, E.A.

Citation

Mol, E. A. (2020, October 7). *Extracellular vesicle therapeutics for cardiac repair: A translational perspective*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137305>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/137305>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden

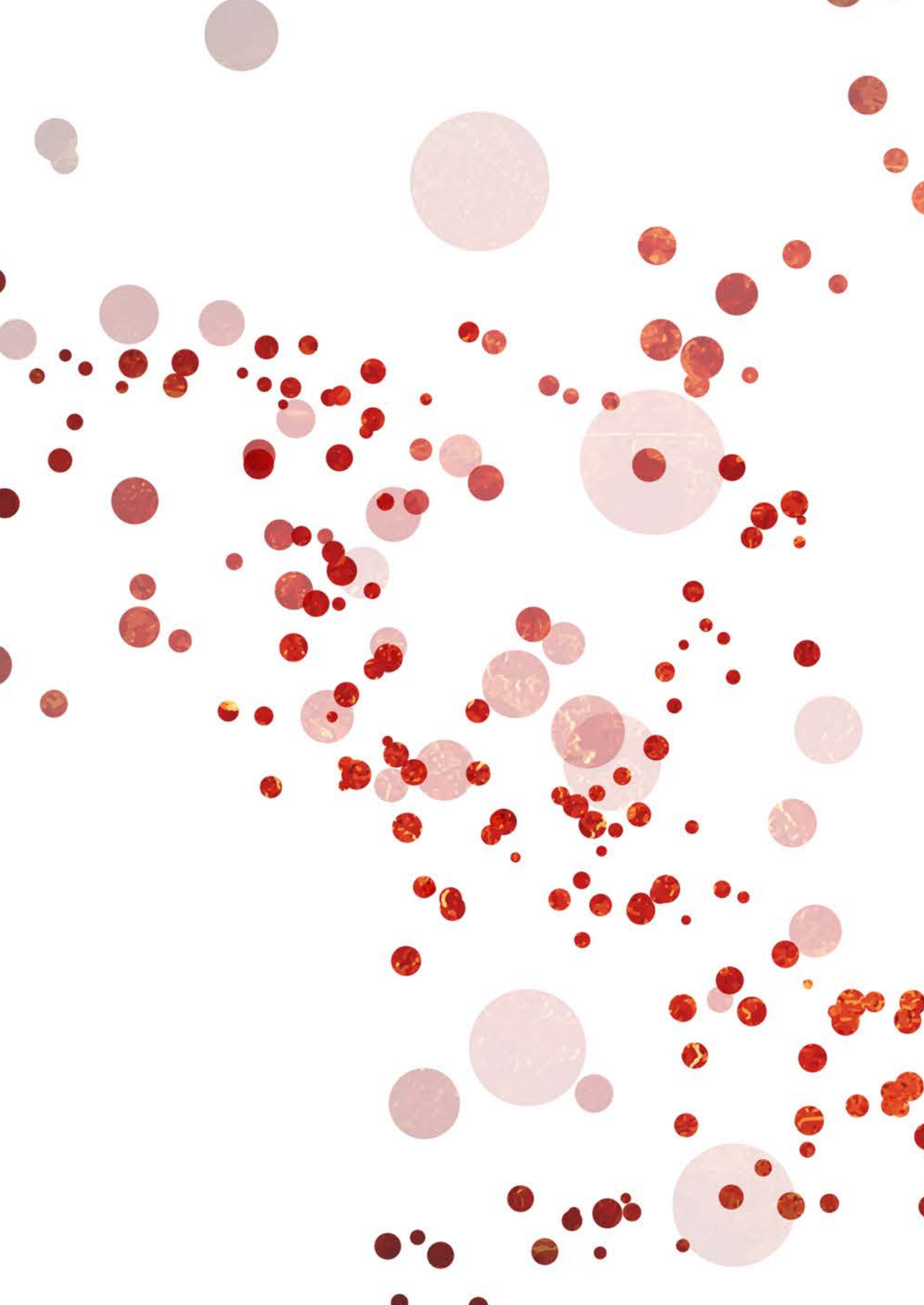


The handle <http://hdl.handle.net/1887/137305> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Mol, E.A.

Title: Extracellular vesicle therapeutics for cardiac repair: A translational perspective

Issue date: 2020-10-07





APPENDIX

Nederlandse samenvatting

Dankwoord

List of Publications

Curriculum Vitae

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Extracellulaire vesicles voor herstel van het hart. Een translationeel perspectief.

Hart- en vaatziekten zijn de nummer één doodsoorzaak wereldwijd. Ze zijn verantwoordelijk voor 32% van het totaal aantal sterfgevallen¹. Voor hartziekten veroorzaakt door onvoldoende doorbloeding van het hart, ook wel een hartinfarct genoemd, is het sterftecijfer geschat op >9 miljoen mensen per jaar. Het hartinfarct wordt veroorzaakt door een bloedprop in één of meerdere bloedvaten die het hart van bloed voorzien. Hierdoor krijgt het hart onvoldoende bloed en sterft er een deel van het hartweefsel af. De laatste eeuw is het aantal doden door een hartinfarct sterk afgenomen, doordat er een verbetering is in de behandeling van een hartinfarct. Deze behandeling is het tijdig heropenen van het bloedvat, ook wel reperfusie genoemd. Ondanks dat er minder patiënten overlijden door het hartinfarct, ontwikkelt 25% van deze patiënten echter hartfalen doordat een deel van het hartweefsel is afgestorven². Bij hartfalen is het hart niet in staat om voldoende bloed rond te pompen naar de rest van het lichaam³. Voor deze chronische patiënten groep is de enige behandeling een hart transplantatie. Het aantal beschikbare donor harten is echter te weinig om te voorzien in de grote behoefte aan donor harten. Hierdoor zijn er andere behandel mogelijkheden nodig en deze worden ook onderzocht. Deze nieuwe behandelingen focussen ofwel op het voorkomen van de ontwikkeling van hartfalen na het hartinfarct, ofwel op het behandelen van de chronische patiënt populatie met hartfalen. Een van de nieuwe behandelopties is het gebruik van stamcellen, welke mogelijk het verlies van hartweefsel kunnen herstellen.

Er worden verschillen type stamcellen onderzocht die het hart mogelijk kunnen repareren. Stamcellen afkomstig uit het hart (progenitor cellen) zouden een aantrekkelijke bron kunnen zijn, aangezien ze uit het hart zelf afkomstig zijn en daardoor het hart ook mogelijk beter kunnen repareren/stimuleren. Daarnaast hebben stamcellen uit het hart de potentie om alle celtypes vormen die voorkomen in het hart^{4,5}. In een studie waarbij stamcellen uit het hart werden ingespoten in het beschadigde hartweefsel kon er opmerkelijk genoeg maar 3-4% van de ingespoten stamcellen terug gevonden worden. Er was echter wel een verbetering in hartfunctie⁶. Het grootste deel van de stamcellen wordt meteen na injectie in het hart weggespoeld door de bloedvaten⁷. Dit is de reden dat wordt er aangenomen dat het positieve effect van de stamcellen veroorzaakt wordt door paracrine factoren, dat wil zeggen, factoren die de cellen uitscheiden. Men heeft aangetoond dat een injectie met alles wat de stamcel produceert en uitscheid in het kweekmedium dezelfde positieve effecten op hartfunctie laten zien na het hartinfarct vergeleken met de injectie van de stamcellen zelf⁸. Wanneer dit kweekmedium van stamcellen werd gescheiden in fracties kleiner en groter dan 1000 kDa werd opgemerkt dat alleen de fracties groter dan 1000 kDa verantwoordelijk waren voor de vermindering van het hartinfarct⁹. Gedetailleerd onderzoek van dit kweekmedium heeft aangetoond dat extracellulaire vesicles (EVs) een belangrijke component zijn van dit kweekmedium, welke reparerende eigenschappen bevatten¹⁰.

EVs zijn kleine blaasjes van nanometer grootte en spelen een belangrijke rol in communicatie tussen cellen in zowel gezonde als zieke condities. Hierdoor zijn EVs afkomstig van stamcellen een interessante bron voor therapeutische toepassingen. EVs bevatten eiwitten, groeifactoren en nucleïne zuren, zoals messenger RNA en microRNAs. Door deze inhoud over te dragen naar het hartweefsel kunnen deze blaasjes bescherming bieden aan het hart na het hartinfarct¹¹⁻¹⁵. In **hoofdstuk 1** is de potentie van EVs afkomstig van stamcellen uit het hart als therapie na het hartinfarct beschreven.

Het doel van dit proefschrift is om het mogelijke gebruik van EVs afkomstig van stamcellen uit het hart als therapie na het hartinfarct te beschrijven en om hierbij te focussen op de stappen die nodig zijn om deze therapie toe te kunnen passen kliniek.

Nu EVs meer en meer geschikte kandidaten blijken te zijn als therapie na het hartinfarct, moeten een aantal belangrijke aspecten onderzocht worden voordat ze als therapie kunnen worden toegepast. Ten eerste, een van de voorwaarden voor het therapeutisch toepassen van EVs is een gestandaardiseerde en reproduceerbare isolatie methode waarmee grote hoeveelheden blaasjes verkregen kunnen worden^{16,17}. De gouden standaard die wereldwijd het meest gebruikt wordt als isolatie methode is ultracentrifugatie (UC). Hierbij worden EVs gesedimenteerd door op grote snelheid te centrifugeren. Deze methode neemt echter veel tijd in beslag, is niet geschikt voor isolatie van grote hoeveelheden EVs en de EV opbrengst is hierbij afhankelijk van de persoon die de isolatie uitvoert^{18,19}. Daarnaast heeft recente literatuur gesuggereerd dat deze methode leidt tot het samenklonteren en/of kapot maken van EVs, mogelijk doordat de EVs met grote snelheid samengedrukt worden^{20,21}. Om deze reden worden er alternatieve EV isolatie methoden onderzocht. Een van deze methoden is ultrafiltratie gecombineerd met kolomchromatografie (SEC)²². Deze methode waarbij EVs worden gescheiden op basis van grootte is meer gestandaardiseerd en ook toepasbaar voor EV isolatie van grote hoeveelheden, wat nodig is voor toepassing in de kliniek. Om te onderzoeken of de isolatie methode van invloed is op de functie van EVs, hebben wij EVs geïsoleerd met UC en met SEC en deze vergeleken in een *in vitro* assay in **hoofdstuk 2**. Wij hebben laten zien dat EVs geïsoleerd met SEC een beter functionaliteit hebben ten opzichte van EVs geïsoleerd met UC. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat bij UC belangrijke signalering moleculen op het oppervlakte van EVs worden vernietigd, waardoor hun activatie, binding, of opname door cellen mogelijk kan worden gehinderd.

Om te onderzoeken of de functionaliteit van EVs verkregen door verschillende isolatie technieken ook *in vivo* veranderd is, hebben wij dit onderzocht in twee veelgebruikte muismodellen van het hartinfarct in **hoofdstuk 3**. Bij het eerste model maken wij gebruik van een permanente ligatie, waarbij er een permanent hartinfarct gemaakt wordt. Het tweede model is een reperfusie model, waarbij het bloedvat een uur na het infarct weer heropend wordt. De EVs afkomstig van stamcellen hebben wij ingespoten in het hartweefsel na het hartinfarct en daarna gekeken of de grootte van het infarct verminderd was. Verrassend genoeg zagen wij geen verschil in infarct grootte tussen controle muizen en muizen behandeld met zowel UC geïsoleerde EVs als SEC geïsoleerde EVs in beide

muismodellen. Hierdoor zijn wij niet in staat te bepalen of er een verschil is in isolatie methode op de functionaliteit van EVs. Onze data is echter verschillend van voorgaande studies die hebben aangetoond dat infarct grootte verminderd was na behandeling met EVs afkomstig van stamcellen van het hart^{14,23,24}. Een recente studie heeft aangetoond dat EVs afkomstig van verschillende soorten stamcellen de infarct grootte kunnen verminderen en hartfunctie kunnen verbeteren²⁵. Het vinden van de primaire factor die dit verschil kan verklaren is daarom van groot belang voordat EVs gebruikt kunnen worden als therapie. Er zijn een aantal verschillen tussen onze studie en voorgaande studies die beschreven zijn in de literatuur. Voorbeelden van deze verschillen zijn het gebruik van een andere donor van de stamcellen waarvan de EVs afkomstig zijn, verschillen in kweekmethodes, het infarct model of dosering en tijd van toediening van de EVs. In de toekomst zullen we moeten uitzoeken welke variabele(n) het verschil in therapeutische effectiviteit kunnen verklaren. Hierna zullen wij dit onderzoek kunnen voortzetten, waarbij we kijken wat het effect is van isolatie methode op de functionaliteit van EVs in diermodellen.

De injectie van stamcellen na het hartinfarct heeft alleen minimale positieve effecten laten zien in klinische patiënten studies, als gevolg van problemen met retentie (het achterblijven van de therapie na injectie)²⁶⁻²⁹. Gezien het feit dat stamcellen meteen uit het hart worden gespoeld na injectie in het hart⁷, kunnen we ditzelfde probleem verwachten na injectie van EVs. Hierdoor worden er strategieën ontworpen om de tijd van blootstelling aan de therapie te kunnen vergroten. Een potentiële methode voor geleidelijke afgifte van EVs en om therapeutische blootstelling te verhogen is voorgesteld in **hoofdstuk 4**. Hier hebben we onderzocht of we een hydrogel gebaseerd op ureido-pyrimidinone units gekoppeld aan een poly(ethylene glycol) ketting (UPy-hydrogel) als mogelijk afgifte systeem konden gebruiken voor EVs. Dit is een hydrogel die een gel vormt na verandering van zuurgraad (pH), zoals bij injectie in het hart. Onze bevindingen laten zien dat EVs geleidelijk worden afgegeven door UPy-hydrogels over een periode van 4 dagen en dat hun biologische activiteit behouden bleef na afgifte door UPy-hydrogels. Daarnaast hebben we aangetoond dat de lokale retentie van EVs verhoogd was na onderhuidse injectie van UPy-hydrogel geladen met EVs in muizen. Ons uiteindelijke doel is om te onderzoeken of deze hydrogels de retentie van EVs kunnen verhogen na injectie in het hart en of geleidelijke afgifte leidt tot betere therapeutische effecten vergeleken met één dosis. Het onderzoeken van EV retentie in het muizenhart is echter lastig doordat een nauwkeurige injectie van zo'n klein volume in het hart een uitdaging is. In verdere studies zullen we moeten kijken of we gebruik kunnen maken van injectie pompen, welke nauwkeuriger kleine volumes in het hart kunnen injecteren of dat we hiervoor gebruik moeten maken van grote diermodellen. Uiteindelijk zou dit kunnen bijdragen aan het verhogen van de effectiviteit van EV therapie na lokale toediening in het hart.

Om de EVs therapeutisch kunnen gebruiken, zullen ze na isolatie bewaard moeten kunnen worden. De mogelijkheid om EVs op te kunnen slaan zonder dat de functionaliteit beïnvloed wordt is van groot belang voor verdere klinische ontwikkeling. Daarom hebben wij in dit proefschrift gekeken naar het effect van opslag condities op EV functionaliteit. Voorgaande

studies die het effect van opslag op EVs onderzoeken hebben veelal gekeken naar het effect van invriezen op EV grootte en hoeveelheid^{30,31}. Er zijn weinig studies hebben gekeken naar het effect op de functionaliteit van EVs. Dat is de reden dat wij in **hoofdstuk 5** hebben onderzocht wat het effect is EV opslag op zowel fysiochemische eigenschappen als functionaliteit *in vitro* en *in vivo*. De fysiochemische eigenschappen van EVs afkomstig van stamcellen van het hart opgeslagen op 4°C en -80°C bleken vergelijkbaar met vers geïsoleerde EVs. Daarnaast vonden wij geen schijnbare verschillen tussen EVs die waren opgeslagen op 4°C en -80°C met betrekking tot hun functionaliteit, onderzocht met behulp van twee angiogenese *in vitro* assays. Dit is in tegenstelling tot andere studies die wel een vermindering van functionaliteit zagen wanneer de EVs werden opgeslagen op 4°C of -80°C voor een tijd variërend tussen 1 en 25 dagen³⁰⁻³². Deze verschillen kunnen verklaard worden door het gebruik van verschillende opslag buffers, vries-dooi procedures of de betrokkenheid van andere cellulaire mechanismen wanneer gebruik wordt gemaakt van EVs afkomstig van andere soorten celtypes. Op weg naar klinische toepassing van EVs is het belangrijk om het effect van EV opslag ook *in vivo* te bekijken. Wij hebben het effect van EV opslag *in vivo* bepaald met behulp van een Matrigel plug assay. Hierbij wordt onderhuids een gel geïnjecteerd met EVs en wordt gekeken naar de hoeveelheid cellen die worden aangetrokken door de EVs vergeleken met controle plugs. We vonden een verhoogde totale infiltratie van cellen in plugs geladen met EVs. We zagen geen verschil tussen 4°C of -80°C opgeslagen EVs. Wanneer de aanwezigheid van endotheel cellen, met behulp van de marker CD31, in plugs geladen met EVs verhoogd is, wijst dit op het stimuleren van vaatgroei door EVs. Wanneer we keken naar het aantal CD31+ endotheel cellen vonden we echter geen verschil tussen plugs geladen met EVs en controle plugs. In voorgaande studies zagen we echter wel verhoogde aantallen CD31+ endotheel cellen wanneer plugs waren geladen met EVs^{13,33}. Mogelijke verklaringen voor dit verschil zouden kunnen zijn dat de infiltrerende cellen wel endotheel cellen zijn, maar dat we ze niet als zodanig detecteren of dat de infiltrerende cellen andere vasculaire markers tot expressie brengen. Een andere verklaring is dat de infiltrerende cellen een andere oorsprong hebben en niet betrokken zijn bij vaatvorming. We moeten dit in de toekomst eerst verder onderzoeken en onze resultaten valideren in grotere aantallen dieren voordat we definitieve conclusies kunnen trekken. Onze data laat echter zien dat een korte opslag van EVs bij -80°C de functionaliteit van EVs niet lijkt te beïnvloeden wanneer dat wordt vergeleken met opslag bij 4°C. Deze studie zou uiteindelijk kunnen bijdragen aan het klinisch gebruiken van EVs als therapie.

Samengevat hebben we in dit proefschrift de eerste stappen gezet om EV productie processen zoals EV isolatie en opslag te verbeteren, zodat we mogelijk de therapeutische toepassing van EVs kunnen versnellen. Een van onze bevindingen was echter dat we geen infarct vermindering zagen na behandeling met EV therapie bij muizen met een hartinfarct. Dit is in tegenstelling tot voorgaande studies die wel positieve effecten zagen na behandeling met EVs. Toekomstige studies zullen moeten focussen op wat dit verschil zou kunnen verklaren. Ondanks dat EVs een grote potentie hebben als therapie voor herstel van het hart, zullen we meer te weten moeten komen over het mechanisme waarop EVs hun

positieve effect uitoefenen. Daarnaast zal er meer standaardisatie moeten komen van EV productie processen voordat EVs verder ontwikkeld kunnen worden als therapie voor patiënten met een hartinfarct.

REFERENCES

1. WHO. *Global Health Observatory data*. (2019).
2. Hellermann, J. P. *et al*. Heart failure after myocardial infarction: a review. **9343**, (2000).
3. Kemp, C. D. & Conte, J. V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc. Pathol.* **21**, 365–371 (2012).
4. van Vliet, P. *et al*. Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy. *Neth. Heart J.* **16**, 163–9 (2008).
5. Smits, A. M. *et al*. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat. Protoc.* **4**, 232–243 (2009).
6. Smits, A. M. *et al*. Human cardiomyocyte progenitor cell transplantation preserves long-term function of the infarcted mouse myocardium. *Cardiovasc. Res.* **83**, 527–35 (2009).
7. van den Akker, F. *et al*. Intramyocardial stem cell injection: go(ne) with the flow. *Eur. Heart J.* **38**, 184–186 (2017).
8. Timmers, L. *et al*. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.* **6**, 206–14 (2011).
9. Lai, R. C. *et al*. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* **4**, 214–22 (2010).
10. Arslan, F. *et al*. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* **10**, 301–312 (2013).
11. Ibrahim, A. G. E., Cheng, K. & Marbán, E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports* **2**, 606–619 (2014).
12. Mackie, A. R. *et al*. Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ. Res.* **111**, 312–21 (2012).
13. Vrijzen, K. R. *et al*. Exosomes from Cardiomyocyte Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Stimulate Angiogenesis Via EMMPRIN. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 2555–2565 (2016).
14. Barile, L. *et al*. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* **103**, 530–541 (2014).
15. Sahoo, S. *et al*. Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ. Res.* **109**, 724–8 (2011).
16. Sluijter, J. P. G. *et al*. Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart : Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. 19–34 (2018).
17. Théry, C. *et al*. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **7**, (2018).
18. Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N. & Brisson, A. R. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. **1**, 1–7 (2015).
19. Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G. & Théry, C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* **1**, (2012).
20. Taylor, D. D. & Shah, S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* **87**, 3–10 (2015).
21. Lamparski, H. G. *et al*. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* **270**, 211–226 (2002).
22. Nordin, J. Z. *et al*. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2015).
23. Maring, J. A. *et al*. Cardiac progenitor cell-derived extracellular vesicles reduce infarct size and associate with increased cardiovascular cell proliferation. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **12**, 5–17 (2019).
24. Gallet, R. *et al*. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **38**, 201–211 (2017).
25. Yang, L. *et al*. Stem cell-derived extracellular vesicles for myocardial infarction: A meta-analysis of controlled animal studies. *Aging (Albany, NY)*. **11**, 1129–1150 (2019).
26. Perin, E. C. *et al*. Evaluation of cell therapy on exercise performance and limb perfusion in peripheral artery disease. *Circulation* **135**, 1417–1428 (2017).

27. Rigato, M., Monami, M. & Fadini, G. P. Autologous cell therapy for peripheral arterial disease: systematic review and meta-analysis of randomized, nonrandomized, and noncontrolled Studies. *Circ. Res.* **120**, 1326–1340 (2017).
28. Meyer, G. P. *et al.* Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction. *Circulation* **113**, 1287–1294 (2006).
29. Schachinger, V. *et al.* Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur. Heart J.* **27**, 2775–2783 (2006).
30. Maroto, R., Zhao, Y., Jamaluddin, M., Popov, V. L. & Wang, H. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J. Extracell. Vesicles* **6**, (2017).
31. Park, S. J., Jeon, H., Yoo, S., Lee, M. & Al, P. E. T. The effect of storage temperature on the biological activity of extracellular vesicles for the complement system. 423–429 (2018).
32. Lorincz, A. *et al.* Effect of storage on physical and functional properties of extracellular vesicles derived from neutrophilic granulocytes. **1**, 1–8 (2014).
33. Vrijisen, K. R. *et al.* Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1064–1070 (2010).

