

MikroRNA v mozkomíšním moku jako biomarkery u pacientů s nádory mozku

MicroRNAs in Cerebrospinal Fluid as Biomarkers in Brain Tumor Patients

Kopková A.¹, Šána J.^{1,2}, Večeřa M.¹, Fadrus P.³, Lipina R.⁴, Smrčka M.³, Lojová M.¹, Slabý O.^{1,2}

¹ CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

² Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Neurochirurgická klinika FN Brno

⁴ Neurochirurgická klinika FN Ostrava

Souhrn

Východiska: Ačkoli nádory centrální nervové soustavy (CNS) nepatří mezi nejčastější nádorová onemocnění, jejich incidence v posledních letech stále roste. Naneštěstí se tato skupina vyznačuje velmi špatnou prognózou. Výběr správné terapie záleží na včasné a přesné diagnóze. Diagnostické postupy v případě nádorů mozku jsou však často limitovány jejich lokalizací a značnou heterogenitou nádoru. Proto je věnováno velké úsilí hledání nových diagnostických přístupů a biomarkerů, které by byly dostatečně robustní, senzitivní a specifické, a jejichž analýza by ve vztahu k pacientovi eliminovala nutnost biopsie. Mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid – CSF) přichází do přímého kontaktu s CNS a představuje proto vhodný biologický materiál, který by mohl prostřednictvím biomarkerů reflektovat její aktuální stav. Vhodnými molekulami se v tomto případě zdají být mikroRNA (miRNA), krátké nekódující RNA, které byly již několikrát detekovány v CSF a jejichž deregulované hladiny jsou asociované s různými typy nádorů CNS. **Cíl:** Bohužel metodické přístupy používané pro analýzy miRNA v CSF nebyly zatím dostatečně standardizovány. Z těchto důvodů se v předkládaném přehledovém článku snažíme shrnout a zhodnotit doposud používané metodické přístupy k analýze miRNA z CSF s cílem nalézt ty nejvhodnější. Dále zde sumarizujeme výsledky studií popisující miRNA, které by mohly v budoucnu představovat biomarkery různých nádorových onemocnění CNS.

Klíčová slova

mikroRNA – mozkomíšní mok – nádory mozku – biomarkery

Summary

Background: Although central nervous system (CNS) tumors are not the most common cancers, their incidence rate is constantly growing. Unfortunately, this group of cancers is characterized by a very poor prognosis with a very short average patient survival. Appropriate therapy depends on early and accurate diagnosis. However, this is often limited by brain tumor localization and heterogeneity. Therefore, new diagnostic approaches and biomarkers that are robust, sensitive, specific, and also without need of invasive biopsy, are still being sought. Cerebrospinal fluid (CSF) comes into direct contact with the CNS and becomes a suitable source of biological material that could reflect actual state of CNS. Suitable molecules in this regard appear to be microRNAs (miRNAs), short non-coding RNAs, that have been already detected in CSF and whose dysregulated levels are associated with various types of brain tumors. **Purpose:** Unfortunately, the methodical approaches used for CSF miRNA analysis have not been sufficiently standardized yet. For this reason, we summarize and evaluate methodical approaches which were previously used for miRNA analysis from CSF in order to find the most appropriate ones. Subsequently, we review studies focused on miRNA with potential to become biomarkers of CNS tumors in the future.

Key words

microRNAs – cerebrospinal fluid – brain tumors – biomarkers

Tato studie byla vypracována s grantovou podporou Ministerství zdravotnictví České republiky, granty č. 15-34553A a 15-33158A. Všechna práva vyhrazena.

Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grants No. 15-34553A and 15-33158A. All rights reserved.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
CEITEC – Středoevropský
technologický institut
Masarykova univerzita
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: on.slaby@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 3. 1. 2019

Přijato/Accepted: 3. 1. 2019

doi: 10.14735/amko2019181

Úvod

Primární nádory mozku a mozkové metastázy postihují ve světovém měřítku kolem 40 pacientů ze 100 000 osob ročně a tato incidence stále roste [1,2]. Včasná a přesná diagnostika hraje klíčovou roli v určování prognózy a volby nevhodnější terapie. V současné době je diagnostika mozkových nádorů nejčastěji prováděna na základě zobrazovacích metod jako jsou výpočetní tomografie (computed tomography – CT), magnetická rezonance (magnetic resonance imaging – MRI) a pozitronová emisní tomografie (PET) s následným histologickým posouzením nádorové tkáně. Nicméně i přes značné pokroky a modifikace již zmiňovaných metod je přesná a včasná diagnostika u některých nádorů značně limitována lokalizací a buněčnou heterogenitou nádoru [3]. Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem je důležité vyvinout nové diagnostické postupy, které společně s existujícími metodami zvýší přesnost diagnostiky nádorů mozku, a tím i přežívání pacientů. Stejně jako u jiných typů nádorů se „tekuté biopsie“ a jejich analýza zdají být slibným diagnostickým přístupem. V případě mozkových nádorů je pozornost, především z důvodu existence hematoencefalické bariéry, zaměřena na mozkomíšní mok a jeho možné diagnostické využití [4]. Vhodnými molekulami s potenciálem sloužit jako málo invazivní, dostatečně senzitivní a specifické biomarkery se v tomto ohledu jeví být krátké nekódující RNA, především pak mikroRNA (miRNA), jejichž deregulované hladiny byly detekovány u řady nádorových onemocnění a jsou asociovány s biologickými procesy zapojenými do maligní transformace.

Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid – CSF), likvor, je bezbarvá, čirá tělní tekutina připomínající krevní plazmu, která cirkuluje v mozkových komorách a subarachnoidálních prostorech obklopujících mozek a míchu. Ve srovnání s krevní plazmou však obsahuje méně proteinů, což činí přibližně 15–45 mg/dl, dále pak 50–80 mg/dl glukózy a 0–5 bílých krvinek/ml. Rychlost produkce CSF je 0,3–0,4 ml/min, celkový objem CSF dospě-

lého jedince představuje 90–150 ml a u dětí 65–150 ml. Hlavní funkce CSF je zejména mechanická, chrání mozek před nárazy, dále přispívá k udržování stálého nitrolebního tlaku a slouží jako prostředek k transportu biomolekul a odvádění metabolitů. Vzhledem k tomu, že CSF omývá celou centrální nervovou soustavu (CNS), a dostává se tedy do blízkého kontaktu s jakoukoli možnou patologickou tkání, je považován za ideální zdroj biologického materiálu pro následné diagnostické účely [5–7].

CSF je nejčastěji získáván tzv. lumbální punkcí, je odebírán v oblasti L3–L5 bederních obratlů za použití spinální jehly. Jinou možností odběru CSF je komorová punkce či komorová drenáž, pak získáváme komorový mok. Třetí variantou je odběr tzv. cisternálního moku, který se odebírá subokcipitální nebo laterocervikální punkcí. Při odběru CSF je v určitých případech také možné změřit likvorový tlak. Dále lze posoudit jeho vzhled, a to barvu či přítomnost krve. Další analýzy CSF jsou ihned po odběru prováděny na speciálních pracovištích. V klinické praxi se běžně stanovuje zejména základní cytologie, při které se hodnotí monocytární, lymfatické, myeloidní a nádorové buňky. Také se provádí měření koncentrace celkového proteinu s možnou analýzou diagnostických proteinů, jako je třeba albumin, imunoglobuliny, zánětlivé markery atd. Dále se provádí biochemické vyšetření, při němž je měřena zejména koncentrace různých iontů, laktátu a glukózy, popř. je možné spektrofotometrické vyšetření CSF, jež dokáže zjistit přibližnou dobu krvácení do mozku [8–10].

Jak již bylo řečeno, CSF je považován za tzv. rezervoár látek, které vylučuje ať už zdravá, či patologická tkáň CNS, proto se analýza likvoru jeví jako vhodný prostředek pro diagnostiku nádorů CNS. V poslední době se v onkologické praxi mezi nejčastěji prováděná vyšetření řadí cytologie, která je vysoce specifická při detekci nádorových buněk. Na druhou stranu se jedná pouze o kvalitativní test, jenž postrádá normalizaci a např. jeho senzitivita pro diagnostiku glioblastomu (GBM) se pohybuje pouze okolo 10 % [11]. Další nevýhodou je, že rychlost a uvolňování maligních buněk

do CSF je intermitentní proces, což může vést k vysoké míře chybovosti této metody [5,6,11].

Cirkulující miRNA

Cirkulující mikroRNA (c-miRNA) by mohly představovat perspektivní biomarkery CSF. MiRNA tvoří skupinu jednořetězcových nekódujících RNA s délkou přibližně 18–25 nukleotidů, které posttranskripčně regulují genovou expresi, a hrají tudíž klíčovou roli v regulaci všech buněčných procesů. Tyto molekuly jsou obvykle tkáňově specifické a podílejí se na patogenezi mnoha onemocnění vč. nádorů mozku [12]. Cirkulující miRNA byly detekovány téměř ve všech tělních tekutinách, jako je krevní plazma a sérum, moč, sliny, slzy nebo CSF [13]. Zajímavé je, že c-miRNA jsou vysoce stabilní a odolávají extrémním podmínkám, jako je aktivita ribonukleáz, opakované zmrazování, var, nízké a vysoké pH nebo i skladování při pokojové teplotě [13]. Deregulované hladiny miRNA v CSF jsou podle nedávných studií také asociovány s maligními nádory CNS [14–20]. Například hladina miR-21 u pacientů s gliomy dokázala rozlišit nádorové vzorky CSF s vyšší citlivostí a specificitou než hladiny miR-21 detekované v krevní plazmě [21]. Analýza c-miRNA v CSF proto představuje slibný nástroj potenciálně vedoucí ke zdokonalení současné diagnostiky nádorů mozku [5,6].

Původ cirkulujících miRNA v CSF

O původu c-miRNA v CSF je toho zatím známo málo. Preanalytické a analytické faktory, které by mohly ovlivňovat stanovení jejich hladin, bohužel nejsou dostatečně popsány. Stabilita c-miRNA v tělních tekutinách naznačuje jejich efektivní ochranu před působením ribonukleáz [22]. V současné době bylo popsáno více hypotéz navrhujících možný původ a formy výskytu c-miRNA v CSF. MiRNA vázané na proteinové komplexy (proteiny argonautové rodiny, lipoproteiny o vysoké hustotě) a miRNA umístěné v extracelulárních vezikulách (EV) mohou být aktivně uvolňovány nádorovými buňkami. EV lze dále dělit na exozómy (50–200 nm) a na mikrovezikuly (> 200 nm). Za druhé, nekrotické a apo-

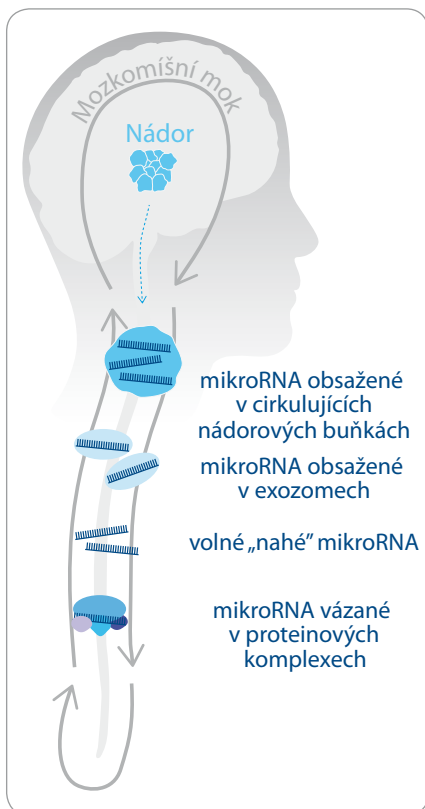


Schéma 1. Souhrn možného výskytu a typu mikroRNA asociovaných s nádory mozku v mozkomíšním moku.

Upraveno dle Shalaby et al, 2015 [5].

ptotické buňky by mohly pasivně vylučovat volně cirkulující tzv. nahé miRNA nebo opět miRNA vázané v proteinových komplexech. Dalším možným zdrojem c-miRNA jsou miRNA pocházející z cirkulujících nádorových buněk (schéma 1). Bohužel analýza cirkulujících miRNA v lidských tělních tekutinách vč. CSF není prozatím dostatečně standardizována [5,23].

Metodické přístupy analýzy miRNA v CSF

Detekce miRNA v CSF zahrnuje následující kroky – zpracování odebraného CSF a jeho uchování, izolaci a expresní analýzy miRNA a na závěr normalizaci a interpretaci finálních dat (schéma 2).

Již samotný odběr CSF může do analýz vnést jisté zkreslení v důsledku preanalytických faktorů, proto by měl být stanoven standardizovaný protokol pro sběr vzorků a jejich zpracování. Takový protokol byl navržen již ve studii Teunissen et al v letech 2009 a 2011 [24,25], v níž byly

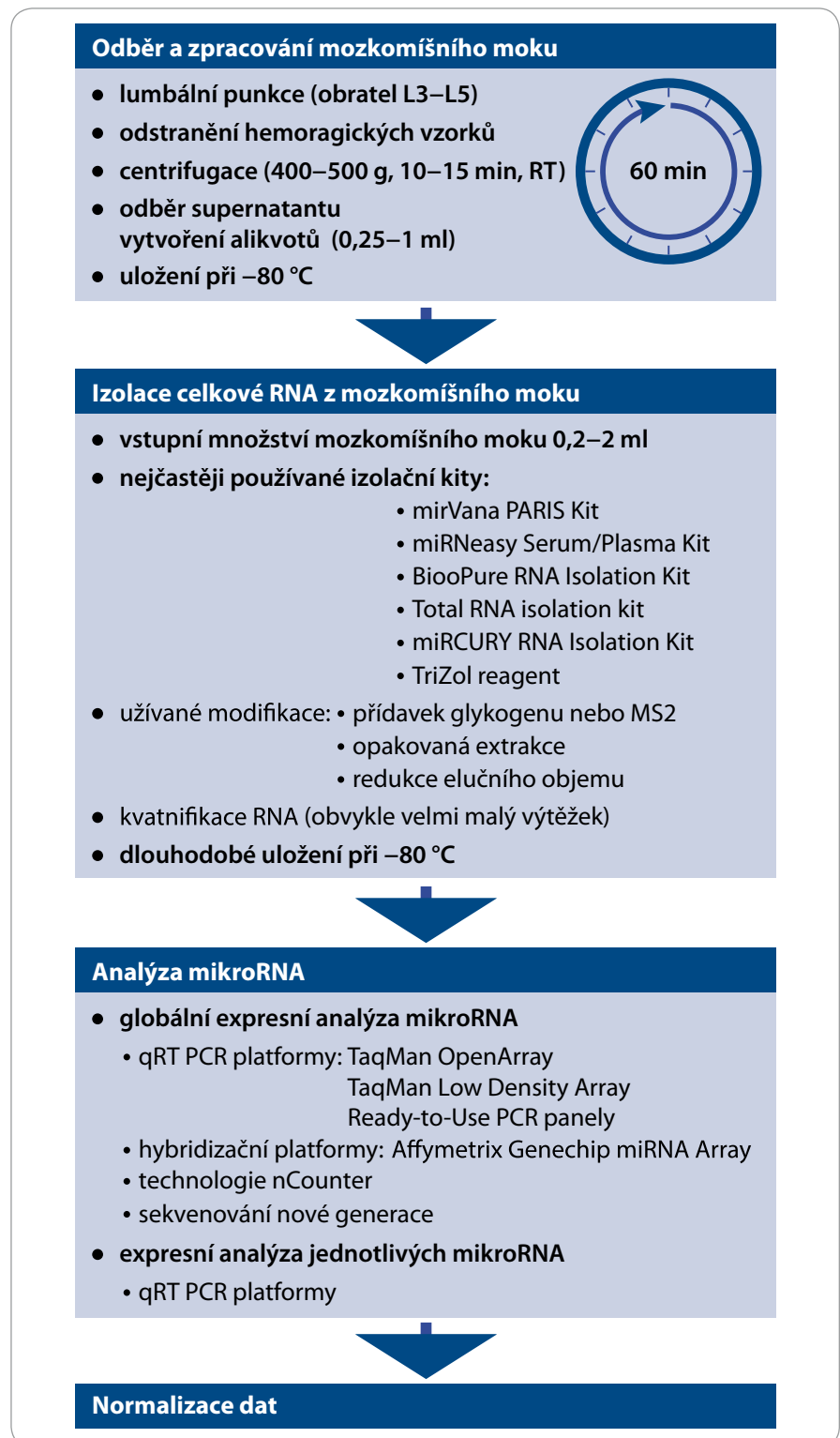


Schéma 2. Schéma shrnující nejčastější metodické postupy při analýze mikroRNA v mozkomíšním moku. Upraveno dle Koptková et al, 2018 [4].

zdůrazněny tři zásadní body pro správné fungování protokolu. Za prvé, jelikož objem odebraného CSF může ovlivnit koncentraci přítomných biomarkerů, do-

poručuje se odebírat alespoň 12 ml CSF. Za druhé, lumbální punkce by měla být vždy provedena mezi L3 a L5 obratlem. A za třetí, vzorky CSF obsahující krevní,

Tab. 1. MikroRNA detekované v mozkomíšním moku s významně rozdílnými hladinami mezi mozgovými nádory a nenádorovými vzorky. Upraveno dle Kopková et al, 2018 [4].

Porovnávané nádory mozku	Hladiny mikroRNA v mozkomíšním moku*	Reference
glioblastom vs. nenádorový vzorek	↑miR-451, ↑miR-223, ↑miR-125b, ↑miR-10b, ↑miR-21	[16,30,17]
glioblastom vs. lymfom	↑miR-711	[17]
glioblastom vs. meduloblastom	↑miR-223, ↑miR-711, ↓miR-125b	[17]
glioblastom vs. mozkové metastázy	↑miR-223, ↓miR-200a, ↓miR-200b, ↓miR-200c, ↓miR-141	[16,17]
meduloblastom vs. nenádorový vzorek	↑miR-451, ↑miR-223, ↑miR-125b	[17]
meduloblastom vs. lymfom	↑miR-711, ↑miR-125b	[17]
meduloblastom vs. mozkové metastázy	↑miR-125b	[17]
mozkové metastázy vs. nenádorový vzorek	↑miR-451, ↑miR-223, ↑miR-125b, ↑miR-10b, ↑miR-21, ↑miR-200a, ↑miR-200b, ↑miR-200c, ↑miR-141	[16,17]
mozkové metastázy vs. lymfom	↑miR-711, ↑miR-223	[17]
lymfom vs. nenádorový CSF	↑miR-21, ↑miR-19b, ↑miR-92a	[14]
gliom (WHO II–IV) vs. nenádorový vzorek	↑miR-21, ↑miR-15b	[15]
gliom (WHO II–IV) vs. PCNSL	↓miR-21, ↑miR-15b	[15]
gliom (WHO II–IV) vs. mozkové metastázy	↓miR-21, ↑miR-15b	[15]

* Hladiny mikroRNA odpovídají první uvedené diagnóze mezi porovnávanými skupinami.

CSF – mozkomíšní mok, PCNSL – primární lymfom centrální nervové soustavy, WHO – klasifikace dle World Health Organization, ↑ – významně vyšší hladina mikroRNA, ↓ – významně nižší hladina mikroRNA

či dokonce kožní buňky musí být vyloučeny. Doba od odběru CSF až po laboratorní zpracování je také důležitá a neměla by přesáhnout 60 min. Rovněž by měl být zaveden protokol samotného laboratorního zpracování CSF, jako jsou podmínky centrifugace a skladování alikvotovaných vzorků. CSF je nejčastěji zpracováván při 500 g, 10 min, za laboratorní teploty. Navzdory tomu, že se miRNA zdají být stabilní v širokém rozmezí teplot, měly by být alikvoty skladovány při -80°C [4].

Několik studií již porovnálo účinnost komerčně dostupných kitů určených pro izolaci krátkých RNA z CSF i s různými modifikacemi protokolů. Nicméně tento proces stále postrádá standardizaci, a proto není snadné zvolit nejúčinnější metodu izolace. V souvislosti se zmiňovanými studiemi a dle našich zkušeností byly nejúčinnější následné modifikace v protokolu:

- 1) zvyšování vstupního objemu CSF, doporučuje se min. 200 μl ;
- 2) přidání čistého glykogenu pro lepší přenos RNA ke kolonce;
- 3) inkubace elučního roztoku na kolonce (alespoň 15 min) a na závěr sni-

žování elučního objemu při konečné eluci [4,26–28].

Vzhledem k nízké koncentraci celkové RNA a krátkých RNA se výrazně snižuje přesnost standardních metod používaných pro kvantifikaci a kontrolu kvality RNA, jako jsou technologie Nanodrop a Qubit. Vhodnou alternativou by mohla být např. automatizovaná kapilární elektroforéza Bioanalyzer (Agilent). Pro analýzu krátkých RNA lze dokonce použít speciální čip schopný detekovat RNA při nízké koncentraci 50 $\text{pg}/\mu\text{l}$. Limitující je ovšem v těchto případech poměr ceny a získaných výstupů za jeden vzorek.

Metody detekce hladin miRNA se dělí do dvou hlavních skupin – analýza jednotlivých miRNA a globální profilování miRNA. V současné době je množství jednotlivých miRNA v CSF měřeno výhradně pomocí modifikovaných real-time PCR (polymerase chain reaction) technologií. Nejčastější metodou je specifická reverzní transkripce s použitím tzv. stem loop primerů a následnou real-time PCR pomocí detekčního systému TaqMan[®] (Thermo Fisher Scientific) [14–16]. Baraniskin et al [14]

potvrdili reprodukovatelnost této metody. Není to však jediný přístup k detekci miRNA. Další studie používala digitální PCR podle protokolu TaqMan. Obdržené výsledky korelovaly s daty ze sekvenování nové generace (next-generation sequencing – NGS), což potvrzuje relevantnost použití digitální PCR pro analýzu hladin miRNA v CSF [29]. Navíc se tato PCR technologie zdá být vhodná právě pro vzorky s nízkou koncentrací RNA a s těžce definovatelnými normalizačními molekulami, jako je právě CSF.

Pro globální profilování miRNA jsou v současné době nejčastěji používány čtyři vysokokapacitní platformy, jmenovitě hybridizační arraye, technologie založené na real-time PCR, platforma nCounter a NGS. Tyto platformy se liší v počtu detekovatelných miRNA, v citlivosti, specifitě, dynamickém rozsahu, množství vstupního materiálu a celkových nákladech potřebných na analýzu. Proto je třeba zohlednit všechny okolnosti profilování před výběrem vhodné vysokokapacitní technologie [4].

Uspokojivý způsob normalizace získaných dat u c-miRNA v CSF není pro-

zatím znám, zejména z toho důvodu, že analýza miRNA v tělních tekutinách je ovlivněna mnoha technologickými a biologickými faktory. U vzorků CSF bylo navrženo několik metod, vč. použití exogenních miRNA (tzv. spike-in metoda) či referenčních endogenních krátkých RNA. Všechny tyto metody však mají své limity. Spike-in miRNA neodráží biologické faktory ovlivňující hladiny c-miRNA. Endogenní krátké RNA, které jsou stabilně exprimovány v buňkách (RNU44, RNU48 a RNU6B), vykazují nízké a nestabilní hladiny ve vzorcích CSF. Kromě toho neodrážejí zcela věrně biogenezi cirkulujících miRNA [20]. Nedávné studie naznačují, že vhodnými referenčními c-miRNA by mohly být také vybrané miRNA, např. miR-24, miR-125, let-7c, miR-21, miR-24, miR-99b, miR-328 a miR-1274B, miR-15a-5p, miR-23p-3p, miR-23b-3p, miR-99a-5p, miR-125b-5p, miR-145-5p, miR-204-5p a miR-320a [15,16,22,23]. Na druhou stranu nezávislá studie již některé miRNA z této skupiny vyvrátila [19].

MiRNA v CSF jako diagnostické biomarkery

Během posledního desetiletí několik studií ukázalo, že deregulované hladiny miRNA v CSF mohou být asociovány s nádory CNS a mohly by tak představovat novou skupinu možných diagnostických biomarkerů.

V roce 2012 Baraniskin et al publikovali studii, ve které hladiny miR-15b a miR-21 v CSF byly vyšší u vzorků pacientů s gliomem než u kontrolních pacientů. Při rozsáhlejší porovnání pak vzorky od pacientů s gliomem vykazovaly vyšší hladiny miR-15b a nižší hladiny miR-21 než vzorky od pacientů s primárním lymfomem CNS (primary central nervous system lymphoma – PCNSL). Na základě těchto výsledků autoři studie navrhuji miR-15b a miR-21 jako možné diagnostické biomarkery [14,15].

V další studii Teplyuka et al byla detekována miR-10b téměř ve všech vzorcích CSF pacientů s GBM, tato miRNA byla také přítomna u většiny vzorků CSF pacientů s mozkovými a leptomeningeálními metastázami nádoru prsu a plic. Dokonce u některých vzorků CSF od

pacientů s detekovanou miR-10b bylo negativní cytologické vyšetření a také u žádného kontrolního vzorku nebyla potvrzena přítomnost této miRNA. Proto by miR-10b mohla představovat slibný biomarker gliomů vyššího stupně malignity a metastatických nádorů mozku. Dále v této studii byly detekovány miR-200a, miR-200b, miR-200c a miR-141, kdy se tyto miRNA vyskytovaly vysoce specificky u mozkových metastáz ve srovnání se vzorky GBM. Následně bylo ve studii zjištěno, že miR-200a a miR-200b se častěji objevuje v CSF u metastatických pacientů s primárním nádorem prsu než u pacientů s primárním nádorem plic. Tyto výsledky ukazují, že rodina miR-200 by mohla být slibným biomarkerem schopným klasifikovat mozkové metastázy a místo vzniku primárního nádoru [16].

Drusco et al hledali pomocí metody NanoString nCounter možné diagnostické biomarkery nádorů CNS v CSF, kdy do studie bylo zařazeno 34 neoplastických pacientů a 14 zdravých kontrol. Vzorky byly dále rozděleny do sedmi skupin podle různých nádorových onemocnění – GBM, meduloblastom, plicní metastázy, metastázy prsu, PCNSL benigní a normální. Výsledky byly dále validovány za použití qRT-PCR (quantitative reverse transcription PCR) a hybridizace in situ. Hladiny miR-125b, miR-223, miR-451, miR-711 a miR-935 vykazovaly rozdíly mezi zkoumanými skupinami, což naznačuje, že tyto miRNA mohou být účinnými diagnostickými biomarkery malignit CNS [17].

Grotzer et al analyzovali miRNA v CSF u pacientů s meduloblastomem ve srovnání s kontrolními pacienty. Bylo detekováno 1 254 miRNA v nádorových vzorcích CSF a 86 z těchto miRNA vykazovalo rozdílné hladiny mezi porovnávanými skupinami. Autoři také použili kultivační médium k analýze miRNA vylučovaných buňkami meduloblastomu. Padesát sedm detekovaných miRNA bylo specifických pro buněčné linie související s metastázami, které představují nejagresivnější subtypy meduloblastomu. Je zajímavé, že tři miRNA asociované s metastázami (miR-125a, miR-125b a miR-1290y), které byly nadměrně zastoupeny v kultivač-

ním médiu buněčných linií, byly rovněž detekovány ve vzorcích CSF od pacientů s meduloblastomem [18].

V další studii Akers et al analyzovali hladiny miR-21 v EV extrahovaných z CSF od 13 pacientů s GBM a 14 zdravých kontrol. Výsledky ukázaly, že hladiny EV miR-21 byly průměrně 5krát vyšší u GBM pacientů než u kontrol. Tato miRNA dokázala rozlišit mezi GBM a kontrolními vzorky s 87% senzitivitou a 93% specifitou. Autoři také změřili hladiny miR-21 v buněčných liniích GBM, přičemž tyto hladiny korelovaly s předšlými výsledky, což naznačuje, že buňky GBM nejspíše aktivně vypouštějí EV obsahující miR-21 [19]. Následně Akers et al publikovali další studii, která naznačuje, že profil miRNA v CSF u pacientů s GBM koreluje s profilem miRNA analyzovaným v nádorové tkáni. Porovnáním GBM a nenádorových vzorků CSF odhalili 9 miRNA s rozdílnými hladinami. Autoři zde také uvedli zajímavé zjištění, jež bylo pozorováno již v předchozích studiích, týkající se významné variability mezi profily miRNA detekovanými v CSF od pacientů s GBM. Toto pozorování znamenalo i ve vlastních výsledcích, kdy byl pozorován signifikantní rozdíl mezi profily miRNA mezi vzorky od tří různých kohort pacientů [20]. Tato variabilita, vezmeme-li v potaz dosud publikovanou literaturu, naznačuje, že profily miRNA v CSF jsou pravděpodobně ovlivněny fyziologickými faktory (např. cirkadiánní rytmus, únava, příjem léků atd.), které lékaři většinou pro výzkumné účely nezaznamenávají. Tudíž, jak již bylo řečeno v kapitole o zpracování CSF, větší objemy odebraného likvoru by mohly snížit tuto variabilitu. Dalším důležitým zjištěním byl poměrně značný rozdíl v profilu miRNA mezi cisternálním a lumbálním mokem. MiRNA detekované v cisternálním moku byly schopné odlišit nádorové vzorky se 67% senzitivitou a 80% specifitou oproti miRNA v lumbálním moku, kde tyto hodnoty činily 28 a 95 %. V této studii bylo také zjištěno, že > 95 % miRNA nalezených v EV bylo zastoupeno v celém objemu CSF. Běžně zpracovaný CSF by tedy měl stačit pro profilování miRNA [20]. Tab. 1 shrnuje studie porovnáující hladiny miRNA mezi různými nádory CNS.

Závěr

Cirkulující miRNA v CSF se zdají být slibnými biomarkery, které by mohly pomoci zlepšit současnou diagnostiku nádorů mozku. Analýza těchto krátkých nekódujících RNA v CSF však stále není zcela standardizována a existuje mnoho faktorů, které by mohly ovlivnit výsledky. Optimalizace a standardizace jednotlivých kroků celého analytického procesu by tak mohla přiblížit miRNA detekovanou v CSF ke klinickému využití.

Literatura

- de Robles P, Fiest KM, Frolkis AD et al. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuro Oncol* 2015; 17(6): 776–783. doi: 10.1093/neuonc/nou283.
- Nayak L, Lee EQ, Wen PY. Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep* 2012; 14(1): 48–54. doi: 10.1007/s11912-011-0203-y.
- Ahmed R, Oborski MJ, Hwang M et al. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Manag Res* 2014; 6: 149–170. doi: 10.2147/CMAR.S54726.
- Kopkova A, Sana J, Fadrus P et al. Cerebrospinal fluid microRNAs as diagnostic biomarkers in brain tumors. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(6): 869–879. doi: 10.1515/cclm-2017-0958.
- Shalaby T, Grotzer MA. Tumor-associated CSF microRNAs for the prediction and evaluation of CNS malignancies. *Int J Mol Sci* 2015; 16(12): 29103–29119. doi: 10.3390/ijms161226150.
- Shalaby T, Achini F, Grotzer MA. Targeting cerebrospinal fluid for discovery of brain cancer biomarkers. *J Cancer Metastasis Treat* 2016; 2: 176–187. doi: 10.20517/2394-4722.2016.12.
- Johanson, CE, Nuncan JA, Klinge PM et al. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008; 5: 10. doi: 10.1186/1743-8454-5-10.
- Kelbich P, Adam P, Sobek O et al. Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému. *Neurol Praxi* 2009; 10(5): 285–289.
- Jurado R, Walker HK. Cerebrospinal fluid. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW (eds). *Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths 1990.
- Adam P, Sobek O, Doležil D et al. Speciální likvirologie: Specifické proteiny likvoru. *Labor Aktuell* 2009; 4: 9–12.
- Balhuizen JC, Bots GT, Schaberg A et al. Value of cerebrospinal fluid cytology for the diagnosis of malignancies in the central nervous system. *J Neurosurg* 1978; 48(5): 747–753. doi: 10.3171/jns.1978.48.5.0747.
- Sana J, Hajduch M, Michalek J et al. MicroRNAs and glioblastoma: roles in core signalling pathways and potential clinical implications. *J Cell Mol Med* 2011; 15(8): 1636–1644. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01317.x.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry* 2010; 56(11): 1733–1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
- Baraniskin A, Kuhnenn J, Schlegel U et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood* 2011; 117(11): 3140–3146. doi: 10.1182/blood-2010-09-308684.
- Baraniskin A, Kuhnenn J, Schlegel U et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma. *Neuro Oncol* 2012; 14(1): 29–33. doi: 10.1093/neuonc/nor169.
- Teplýuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G et al. MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro Oncol* 2012; 14(6): 689–700. doi: 10.1093/neuonc/nos074.
- Drusco A, Bottoni A, Lagana A et al. A differentially expressed set of microRNAs in cerebrospinal fluid (CSF) can diagnose CNS malignancies. *Oncotarget* 2015; 6(25): 20829–20839. doi: 10.18632/oncotarget.4096.
- Grotzer M, Shalaby T, Fiaschetti G et al. Detection and quantification of extracellular microRNAs in medulloblastoma. *J Cancer Metastasis Treat* 2015; 1: 67–75. doi: 10.4103/2394-4722.157068.
- Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R et al. MiR-21 in the extracellular vesicles (EVs) of cerebrospinal fluid (CSF): a platform for glioblastoma biomarker development. *PLoS One* 2013; 8: e78115. doi: 10.1371/journal.pone.0078115.
- Akers JC, Hua W, Li H et al. A cerebrospinal fluid microRNA signature as biomarker for glioblastoma. *Oncotarget* 2017; 8(40): 68769–68779. doi: 10.18632/oncotarget.9188.
- Qu K, Lin T, Pang Q et al. Extracellular miRNA-21 as a novel biomarker in glioma: evidence from meta-analysis, clinical validation and experimental investigations. *Oncotarget* 2016; 7(23): 33994–34010. doi: 10.18632/oncotarget.9188.
- Sasayama T, Nakamizo S, Nishihara M et al. Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Neuro Oncol* 2011; 14(3): 368–380. doi: 10.1093/neuonc/nor203.
- Johnstone RM. Exosomes biological significance: a concise review. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(2): 315–321. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.12.001.
- Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neuro* 2009; 73(22): 1914–1922. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2.
- Teunissen CE, Tuman H, Bennett JL et al. Consensus guidelines for CSF and blood biobanking for CNS biomarker studies. *Mult Scler Int* 2011; 2011: e246412. doi: 10.1155/2011/246412.
- Burgos KL, Javaherian A, Bomprezzi R et al. Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing. *RNA* 2013; 19(5): 712–722. doi: 10.1261/rna.036863.112.
- McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet* 2013; 4: 83. doi: 10.3389/fgene.2013.00083.
- Kopkova A, Sana J, Fadrus P et al. MicroRNA isolation and quantification in cerebrospinal fluid: A comparative methodical study. *PLoS ONE* 2018; 13(12): e0208580. doi: 10.1371/journal.pone.0208580.
- Yagi Y, Ohkubo T, Kawaji H et al. Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes. *Neurosci Lett* 2017; 636: 48–57. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.042.
- Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R et al. miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients. *J Neurooncol* 2015; 123: 205–216. doi: 10.1007/s11060-015-1784-3.