

Glioblastomové organoidy odvozené z nádorové tkáně pacientů jako model pro studium extracelulární komunikace a mikroRNA v nádorovém mikroprostředí

Glioblastoma organoids derived from patient tumor tissue as a model for studying extracellular communication and microRNAs in the tumor microenvironment

Součková K.^{1,2}, Siegl F.¹, Hýždálová M.³, Pěncíková K.³, Vaňková T.¹, Hendrych M.⁴, Fadrus P.⁵, Šána J.^{1,2}

¹ CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

² LF MU, Brno

³ Oddělení farmakologie a toxikologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

⁴ I. ústav patologie, FN u sv. Anny v Brně

⁵ Neurochirurgická klinika LF MU a FN Brno

Souhrn

Glioblastom (GBM) představuje nejagresivnější primární nádor mozku u dospělých pacientů a je charakterizován výraznou buněčnou heterogenitou a komplexní komunikací mezi nádorovými buňkami a nádorovým mikroprostředím. Extracelulární vezikuly (EVs) a jimi přenášené mikroRNA (miRNA) představují významné mediátory mezibuněčné signalizace a současně potenciální zdroj biomarkerů využitelných v diagnostice gliomů. Pro studium těchto procesů jsou nezbytné experimentální modely schopné zachovat biologické vlastnosti původního nádoru. V této práci jsme připravili glioblastomové organoidy (GBO) odvozené z nádorové tkáně pacientů a analyzovali extracelulární miRNA přítomné v EVs izolovaných z kondicionovaných médií. Současně byly analyzovány miRNA obsažené v EVs izolovaných z mozkomíšního moku (CSF) pacientů s gliomy různého stupně malignity. Celkem bylo úspěšně založeno, dlouhodobě kultivováno a kryokonzervováno 12 GBO kultur. Imunohistochemická analýza potvrdila přítomnost markerů typických pro glioblastomové buňky (nestin, GFAP, Sox2). U časně kultivovaných organoidů byly současně detekovány i buněčné populace reprezentující nádorové mikroprostředí, vč. endoteliálních buněk (CD31) a mikroglií (CD163). V některých případech byly přítomny také reaktivní astrocyty a neurony. V EVs izolovaných z kondicionovaných médií GBO a primárních GBM kultur byly identifikovány vysoce abundanční miRNA, vč. hsa-miR-21-5p, členů rodiny let-7, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-125b-5p a dalších. Tyto miRNA byly současně detekovány také v EVs izolovaných z CSF pacientů s GBM a high-grade gliomy. Naopak miR-204-5p, dominantně zastoupená v CSF vzorcích, byla v EVs z nádorových kultur zastoupena minimálně, což naznačuje možný původ této miRNA v nenádorové mozkové tkáni. Prezentovaná data podporují využití GBO odvozených z nádorové tkáně pacientů jako vhodného modelu pro studium mezibuněčné komunikace a extracelulární signalizace v GBM a současně ukazují potenciál EV-asociovaných miRNA jako biomarkerů nádorového mikroprostředí.

Klíčová slova

glioblastom – organoid – mikroRNA

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

The authors declare that 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.



doc. Mgr. Jiří Šána, Ph.D.

Biologický ústav
Lékařská fakulta
Masarykova univerzita
Kamenice 5
625 00 Brno
jiri.sana@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 1. 6. 2026

Přijato/Accepted: 9. 6. 2026

doi: 10.48095/ccko202625130

Summary

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive primary brain tumor in adult patients and is characterized by significant cellular heterogeneity and complex interactions between tumor cells and the tumor microenvironment. Extracellular vesicles (EVs) and the microRNAs (miRNAs) they carry are important mediators of intercellular signaling and, at the same time, a potential source of biomarkers useful in the diagnosis of gliomas. Experimental models capable of preserving the biological properties of the original tumor are essential for studying these processes. In this study, we prepared glioblastoma organoids (GBOs) derived from patient tumor tissue and analyzed extracellular miRNAs present in EVs isolated from conditioned media. Concurrently, we analyzed miRNAs contained in EVs isolated from cerebrospinal fluid (CSF) of patients with gliomas of varying degrees of malignancy. A total of 12 GBOs cultures were successfully established, long-term cultured, and cryopreserved. Immunohistochemical analysis confirmed the presence of markers typical of glioblastoma cells (Nestin, GFAP, Sox2). In early-stage organoids, cell populations representing the tumor microenvironment were also detected, including endothelial cells (CD31) and microglia (CD163). In some cases, reactive astrocytes and neurons were also present. Highly abundant miRNAs were identified in EVs isolated from conditioned media of GBO and primary GBM cultures, including hsa-miR-21-5p, members of the let-7 family, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-125b-5p, and others. These miRNAs were simultaneously detected in EVs isolated from the CSF of patients with GBM and high-grade gliomas. In contrast, miR-204-5p, which was predominantly present in CSF samples, was minimally represented in EVs from tumor cultures, suggesting a possible origin of this miRNA in non-tumor brain tissue. The presented data support the use of GBOs derived from patient tumor tissue as a suitable model for studying intercellular communication and extracellular signaling in GBM and simultaneously demonstrate the potential of EV-associated miRNAs as biomarkers of the tumor microenvironment.

Key words

glioblastoma – organoid – microRNA

Úvod

Glioblastom (GBM) představuje nejagresivnější primární nádor centrální nervové soustavy dospělých a navzdory pokrokům v chirurgické léčbě, radioterapii a systémové terapii zůstává spojen s nepříznivou prognózou [1,2]. Jedním z hlavních důvodů terapeutického selhání je výrazná buněčná heterogenita nádoru a komplexní interakce mezi nádorovými buňkami a nádorovým mikroprostředím [3,4]. Studium těchto procesů vyžaduje experimentální modely, které co nejvíce zachovávají biologické vlastnosti původní nádorové tkáně.

V posledních letech se jako perspektivní model ukazují glioblastomové organoidy (GBO) odvozené přímo z nádorové tkáně pacientů [5,6]. Na rozdíl od klasických dvourozměrných kultur umožňují zachovat prostorovou organizaci nádoru, buněčnou heterogenitu a částečně i složky nádorového mikroprostředí. Současně představují vhodný systém pro studium mezibuněčné komunikace zprostředkované extracelulárními vezikulami (EV).

EV jsou významnými mediátory mezibuněčné signalizace. Přenášejí proteiny, lipidy i nukleové kyseliny vč. mikroRNA (miRNA), které mohou ovlivňovat biologické chování cílových buněk [7].

EV asociované miRNA jsou proto intenzivně studovány jako potenciální biomarkery gliomů a současně jako regulatory nádorové progresy [8].

Cílem této práce bylo připravit GBO odvozené z nádorové tkáně pacientů, charakterizovat jejich buněčné složení a analyzovat miRNA přítomné v EV izolovaných z kondicionovaných médií organoidů. Získané výsledky byly následně porovnány s profily miRNA detekovanými v EV izolovaných z mozkomíšního moku (cerebrospinal fluid – CSF) pacientů s GBM.

Materiál a metody

Pacienti a odběr biologického materiálu

Nádorová tkáň byla získána od 20 pacientů s histologicky potvrzeným GBM během standardního neurochirurgického výkonu. Vzorky CSF byly odebrány před zahájením chirurgického zákroku pomocí lumbální punkce, která byla standardně prováděna v meziobratlovém prostoru L3/L5, od 57 pacientů s GBM. Vzorky CSF vykazující příměsk krvi byly ze studie vyloučeny. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se zařazením jejich biologického materiálu do studie. Projekt byl schválen Lokální etickou komisí FN Brno pod číslem EKV-2021-082.

Příprava a kultivace glioblastomových organoidů

Bezprostředně po odběru byla nádorová tkáň promyta ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku (phosphate-buffered saline – PBS) a zbavena nekrotických a hemoragických částí. Následně byla mechanicky rozmělněna na fragmenty tkáně o velikosti přibližně 0,5–1 mm. Po inkubaci v erytrocytárním lyzačním pufru a opakovaném promytí byly fragmenty přeneseny do ultra-low attachment kultivačních destiček a kultivovány v definovaném médiu obsahujícím DMEM/F12, Neurobasal medium, N2 a B27 suplement, GlutaMAX, neesenční aminokyseliny, humánní inzulin, penicilin/streptomycin a epidermální růstový faktor (epidermal growth factor – EGF) a fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor – FGF). Organoidy byly zhodnoceny pomocí imunohistochemické analýzy za účelem průkazu markerů Nestin, GFAP, Sox2, Olig-2, CD31, CD163 a CD3. Organoidy byly kultivovány po dobu 14 dnů, poté bylo odebráno kondicionované médium určené k izolaci EV.

Izolace extracelulárních vezikul

Extracelulární vezikuly byly izolovány jak z CSF pacientů, tak z kondicionovaných médií metodou diferenciální ultracentrifugace podle protokolu Théry et al. [8]

s využitím 30% sacharóзовého polštáře pro finální purifikaci. Fyzikální charakteristiky izolovaných vezikul byly hodnoceny metodou Multi-Angle Dynamic Light Scattering (MADLS) na přístroji Zetasizer Ultra.

Small RNA-Seq

Celková RNA obohacená o krátké RNA byla z EV izolována pomocí kitu miR-Neasy Serum/Plasma Kit. Small RNA knihovny byly připraveny pomocí QIAseq miRNA Library Kit a sekvenovány na platformě NextSeq 500 v režimu single-end 75 bp. Bioinformatické zpracování zahrnovalo kontrolu kvality pomocí FastQC, odstranění adaptorových sekvencí nástrojem cutadapt, odstranění PCR (polymerázová řetězová reakce) duplikátů na základě UMI (unikátní molekulární identifikátor) sekvencí, mapování na databázi miRBase v21 pomocí nástroje miraligner a statistickou analýzu v prostředí R za využití balíčku DESeq2.

Výsledky

Z 20 získaných vzorků nádorové tkáně se povedlo úspěšně založit 12 GBO kultur. Imunohistochemická analýza prokázala expresi markerů Nestin, GFAP, Sox2 a Olig-2, které silně nasvědčují přítomnosti nádorových, resp. GBM buněk. Současně byly v časně kultivovaných organoidech detekovány CD31 pozitivní endoteliální buňky a CD163 pozitivní buňky – mikroglie či makrofágy. Naopak přítomnost CD3 pozitivních T-lymfocytů pozorována nebyla. Tyto výsledky dokládají zachování nejen nádorových buněčných populací, ale také části buněk nádorového mikroprostředí.

Pomocí Small RNA-Seq bylo následně identifikováno celkem 854 unikátních miRNA přítomných jak v EV získaných z CSF 57 pacientů s GBM, tak v EV izolovaných z 12 vzorků kondiciovaného média po kultivaci GBO. Při použití prahu více než 10 čtení bylo identifikováno 47 miRNA společně přítomných v EV izolovaných z organoidů i v EV získaných z CSF pacientů. Naopak 759 miRNA bylo nízké zastoupených v obou typech analyzovaných vzorků. Analýza diferenciální exprese odhalila skupinu miRNA zvý-

šeně zastoupených v EV produkovaných organoidy. Mezi nejvýznamnější patřily miR-100-5p, miR-126-3p, miR-140-3p, miR-143-3p, miR-151a-3p, miR-191-5p, miR-21-5p, miR-221-3p, miR-24-3, miR-25-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-93-5p a miR-99b-5p. Naopak mezi miRNA s nižším zastoupením v EV organoidů ve srovnání s CSF patřily miR-10a-5p, miR-1298-5p, miR-150-5p, miR-184, miR-1911-5p, miR-203a-3p, miR-205-5p, miR-34c-5p a miR-9-5p. Zvláštní pozorost zasloužila hsa-miR-204-5p, která byla výrazně zastoupena ve vzorcích CSF, zatímco v EV produkovaných organoidy byla přítomna pouze minimálně.

Diskuze

Předložená studie naznačuje využitelnost GBO odvozených přímo z nádorové tkáně pacientů jako modelu pro studium extracelulární komunikace v GBM. Výhodou použité metodiky je skutečnost, že organoidy byly vytvářeny z malých fragmentů nádorové tkáně bez úplné disociace na jednotlivé buňky. Tento přístup pravděpodobně přispívá k zachování buněčné heterogenity a mezibuněčných interakcí přítomných v původním nádoru.

Imunohistochemická analýza provedená po 28 dnech kultivace GBO prokázala přítomnost markerů Nestin, GFAP, Sox2 a Olig2, které jsou charakteristické pro GBM buňky a gliomové kmenové populace. Současná detekce CD31⁺ a CD163⁺ buněk naznačuje zachování endoteliálních a imunitních složek nádorového mikroprostředí. CD31⁺ a CD163⁺ jsme u vybraných GBO kultur pozorovali dokonce i po 8 měsících jejich kultivace (data nejsou prezentována). Tyto výsledky tedy jednoznačně podporují využití organoidů jako biologicky relevantního modelu, který lépe odráží komplexitu nádoru než běžně používané dvourozměrné kultury.

Významným zjištěním studie je vysoká míra shody miRNA profilů mezi oběma typy vzorků. Vedle 47 miRNA hojně zastoupených jak v EV izolovaných z organoidů, tak v EV získaných z CSF pacientů bylo dalších 759 miRNA nízké zastoupených v obou analyzovaných souborech. Celkem tedy 806 z 854 identifikovaných

miRNA vykazovalo shodný profil v EV produkovaných organoidy i v EV přítomných v CSF pacientů.

Tento vysoký stupeň překryvu naznačuje, že GBO zachovávají podstatné charakteristiky extracelulární komunikace probíhající *in vivo*. Výsledky tak podporují jejich využití jako biologicky relevantního modelu pro studium miRNA asociovaných s EV a naznačují, že organoidy mohou sloužit jako vhodná experimentální platforma pro analýzu mechanismů regulujících složení EV v CSF pacientů s GBM.

Současně byla identifikována menší skupina miRNA vykazující rozdílné zastoupení mezi oběma typy vzorků. Tyto rozdíly mohou odrážet vliv nenádorových složek mozkového mikroprostředí, systémových faktorů přítomných *in vivo* nebo změny vznikající během kultivace organoidů. Analýza těchto odlišně exprimovaných miRNA může v budoucnu přispět k lepšímu pochopení původu jednotlivých EV a jejich biologických funkcí v nádorovém mikroprostředí. Zajímavým nálezem je rozdílná distribuce miR-204-5p. Její vysoké zastoupení v CSF a současně minimální přítomnost v EV produkovaných organoidy naznačují, že tato miRNA nemusí pocházet primárně z nádorových buněk. Pravděpodobným zdrojem mohou být buňky okolní mozkové tkáně nebo další složky nádorového mikroprostředí. Tento výsledek podporuje hypotézu, že profil extracelulárních miRNA v CSF odráží nejen biologii samotného nádoru, ale také odpověď okolní tkáně na jeho přítomnost.

Závěr

GBO odvozené z nádorové tkáně pacientů představují vhodný model pro studium extracelulární komunikace v GBM. Zachovávají klíčové buněčné populace původního nádoru a současně reprodukovat významnou část extracelulárního miRNA profilu detekovaného v CSF pacientů. Výsledky podporují využití patientských organoidů při studiu biologických funkcí EV a při hledání nových biomarkerů GBM. Současně naznačují, že některé miRNA mohou odrážet biologickou aktivitu nenádorových složek mozkového mikroprostředí.

Dedikace

Práce byla podpořena projektem AZV MZ ČR NU22-03-00290.

Literatura

1. Ostrom QT, Price M, Neff C et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states. *Neuro-Oncology* 2025; 27 (Suppl 4): iv1–iv66. doi: 10.1093/neuonc/noaf194.
2. Weller M, van den Bent M, Preusser M et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; 18(3): 170–186. doi: 10.1038/s41571-020-00447-z.
3. Neftel C, Laffy J, Filbin MG et al. an Integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell* 2019; 178(4): 835–849. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.024.
4. Quail DF, Joyce JA. The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell* 2017; 31(3): 326–341. doi: 10.1016/j.ccell.2017.02.009.
5. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY et al. A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral heterogeneity. *Cell* 2020; 180(1): 188–204. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.036.
6. Hubert CG, Rivera M, Spangler LC et al. A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found In vivo. *Cancer Res* 2016; 76(8): 2465–2477. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2402.
7. Théry C, Witwer KW, Aikawa E 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* 2018; 7(1): 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
8. Ebrahimkhani S, Vafaei F, Hallal S et al. Deep sequencing of circulating exosomal microRNA allows non-invasive glioblastoma diagnosis. *NPJ Precis Oncol* 2018; 2: 28. doi: 10.1038/s41698-018-0071-0.