

## ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ГЛИОБЛАСТОМЫ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

*В.А. Майоров\*, О.В. Тихонова, В.Г. Згода*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*эл. почта: vamaiofov23@gmail.com

Мультиформная глиобластома (ГБМ) — наиболее агрессивная первичная опухоль головного мозга, характеризующаяся крайне неблагоприятным прогнозом. Трудности в диагностике и мониторинге данного заболевания создают необходимость поиска минимально инвазивных подходов, среди которых перспективным направлением считается жидкостная биопсия. Данный обзор посвящен анализу результатов современных исследований, направленных на поиск циркулирующих белковых биомаркеров ГБМ в плазме и сыворотке крови. В качестве биомаркеров рассматриваются свободно циркулирующие белки плазмы крови и белки, находящиеся в составе внеклеточных везикул (ВнВ). В обзоре обобщены результаты работ, использующих для поиска белковых биомаркеров как иммунохимические методы, так и масс-спектрометрические подходы, а также представлен перечень выявленных потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров. Анализ представленных в литературе работ показывает, что протеомный анализ, сосредоточенный на фракции ВнВ плазмы крови, существенно расширяет возможности поиска биомаркеров для неинвазивной диагностики и мониторинга ГБМ.

**Ключевые слова:** глиобластома; циркулирующие маркеры; внеклеточные везикулы; протеомика

**DOI:** 10.18097/PBMCR1637

### ВВЕДЕНИЕ

Мультиформная глиобластома (ГБМ) — наиболее распространённая злокачественная опухоль головного мозга, на долю которой приходится 48,6% первичных злокачественных опухолей центральной нервной системы (ЦНС) и 14,5% от всех опухолей ЦНС [1]. По гистологической структуре ГБМ представляют собой злокачественные опухоли астроцитарного происхождения. Особенностью ГБМ является неоднородность структуры опухолевой ткани: очаги некроза чередуются с плотными регионами пролиферирующей ткани, а также с регионами кистозной дегенерации и очагами кровоизлияний. Сами новообразования, как правило, единичны, имеют неправильную форму и возникают в белом веществе головного мозга [2]. ГБМ на сегодняшний день характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом и высокой смертностью (медианное значение выживаемости составляет 15 месяцев) [1]. В большинстве случаев для лечения ГБМ применяется мультимодальный подход, при котором в первую очередь осуществляется максимальное безопасное для пациента хирургическое удаление опухоли (maximal safe surgical resection), позволяющее, в том числе, провести гистологическое и генетическое изучение опухолевой ткани. Далее следует радиотерапевтическое лечение, сопровождаемое курсом химиотерапии темозоломидом. В качестве вспомогательной терапии также может применяться терапия переменными электрическими полями (ТТФ) [3]. В диагностике ГБМ широко применяются методы, основанные на магнитно-

резонансной томографии (МРТ): в частности, МРТ-перфузия (perfusion weighted imaging) позволяет детектировать повышение кровотока в опухолевой ткани, а МР-спектропия регистрирует увеличение соотношений холин/Н-ацетиласпартат и холин/креатинин, коррелирующее с прогрессией опухоли [4]. Однако данные методики обладают рядом ограничений: МРТ не всегда позволяет отличить ГБМ от других новообразований (глиом более низкой степени злокачественности, метастазов других опухолей) или патологических состояний ткани мозга (воспаление, отёк, кровоизлияния), а также рецидив опухоли от псевдопрогрессии [5]. В связи с этим широкое применение получили молекулярно-биологические методы, позволяющие как проводить поиск маркеров конкретного заболевания, так и идентифицировать молекулярные механизмы, лежащие в основе его возникновения и развития [6]. Наиболее релевантным материалом для такого исследования является опухолевая ткань, однако её получение представляет собой высокоинвазивную процедуру [7].

В последние 20 лет широкое распространение получили методики, объединяемые термином "жидкостная биопсия". При таком подходе опухолевые маркеры идентифицируют в жидких средах организма, в частности, в плазме или сыворотке крови, которые могут быть отобраны неоднократно при существенно меньшем риске для здоровья пациента [8]. Детектируемые в таком материале опухолевые биомаркеры принято называть циркулирующими, к ним относятся, в частности,



внеклеточная опухолевая ДНК (cfDNA; cell-free DNA) и миРНК (miRNA; microRNA), циркулирующие опухолевые клетки, а также белки и внеклеточные везикулы (ВнВ) [5, 9].

Присутствие маркеров ГБМ в крови обусловлено повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) в опухолевой ткани, наблюдаемой как при ГБМ, так и при доброкачественных опухолях головного мозга [10, 11]. Среди возможных механизмов, обуславливающих повышенную проницаемость ГЭБ в опухолевой ткани, выделяют: повышенную экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), стимулирующую формирование “незрелых” сосудов с высокой проницаемостью стенок, и физическое нарушение целостности ГЭБ опухолевыми клетками (в частности, за счёт вытеснения астроцитарных отростков) [12, 13]. Кроме того, в эндотелии опухолевых сосудов отмечается пониженное содержание белков плотных контактов. Эндотелий при этом демонстрирует неоднородность структуры: среди “микрососудистых популяций” встречаются как капилляры нормального строения, так и фенестрированные капилляры, а также капилляры с промежутками между эндотелиальными клетками [14]. Примечательно также, что результаты исследований моделей ГЭБ *in vitro* демонстрируют повышение проницаемости ГЭБ при дифференциации клеток ГБМ [15]. Биомаркеры белковой природы представляют интерес для исследователей, поскольку непосредственным образом вовлечены в большинство молекулярных процессов и сигнальных путей, ассоциированных с возникновением и развитием опухоли.

## 1. СВОБОДНЫЕ БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ В КРОВИ

### 1.1. Поиск белковых биомаркеров ГБМ с использованием иммунохимических методов

Иммунохимические методики получили широкое распространение в исследованиях биологических жидкостей в силу высокой чувствительности и специфичности, а также сравнительно небольшого требуемого количества биоматериала. Такие методики, как иммуноферментный анализ (ИФА), принято считать золотым стандартом для количественного определения белков в клинических исследованиях [16], с чем отчасти связано широкое применение подобных методик для поиска биомаркеров ГБМ в жидких средах организма.

Так, Carlsson и соавт. исследовали применимость панелей из одноцепочечных вариабельных фрагментов антител (*scFv*) для белкового профилирования плазмы крови пациентов с ГБМ, проходящих иммунотерапию [17]. В ходе работы были выявлены белки, количественно повышенные в образцах, полученных от пациентов с ГБМ, по сравнению со здоровыми людьми: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и интерлейкин 8 (IL-8). Показано, что VEGF вовлечён в такие ключевые процессы в развитии ГБМ, как ангиогенез и пролиферация опухолевых клеток (в том числе

опухолевых стволовых клеток), что обуславливает распространённость терапевтических подходов, направленных на подавление активности данного белка [18, 19]. IL-8 является провоспалительным хемокином, для которого показано участие в развитии некоторых видов злокачественных опухолей посредством С-Х-С хемокиновых рецепторов [20–22]. Кроме того, в этой же работе было выявлено, что содержание цитокинов IL-12 и IFN- $\gamma$ , ответственных за развитие клеточного иммунного ответа, было повышено в плазме крови проходящих иммунотерапию пациентов с ГБМ с наиболее длительной выживаемостью (более 400 дней).

В рамках работы Elstner и соавт. с использованием ИФА было проведено измерение концентраций 13 отобранных исследователями белков в сыворотке крови больных ГБМ и здоровых людей [23]. Среди белков с различиями в концентрации были выделены BMP2, CXCL10 и HSP70, для которых исследователями были определены пороговые концентрации, позволяющие в рамках исследуемой когорты отличить пациентов с ГБМ от здоровых людей с чувствительностью 96% и специфичностью 89%. Кроме того, концентрации белков TSP1, HSP70 и IGFBP3 в сыворотке были предложены исследователями для прогнозирования выживаемости: более длительная выживаемость (более 15 месяцев после удаления опухоли) наблюдалась в двух случаях: 1) TSP1  $\geq$  84,08 мкг/мл; 2) HSP70  $\geq$  0,351 нг/мл и IGFBP3  $\geq$  4,122 мг/мл. Примечательно, что белки TSP1, HSP70 и IGFBP3 были выявлены также в опухолевой ткани по результатам иммуногистохимического анализа, что может говорить об их опухолевом происхождении.

В работе Jung и соавт. было показано, что концентрация глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в плазме крови пациентов с ГБМ значимо повышена по сравнению с пациентами с другими типами опухолей мозга, а также по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, концентрация данного белка коррелировала с такими параметрами ГБМ, как объём опухоли и объём некротизированной области опухоли [24]. Повышение концентрации этого белка в сыворотке крови пациентов с ГБМ по сравнению со здоровыми донорами было подтверждено более поздними публикациями, в которых также была определена пороговая концентрация GFAP ( $\geq$  0,01–0,014 нг/мл) позволяющая отличить пациентов с ГБМ от здоровых людей и пациентов с другими новообразованиями головного мозга [25, 26].

Работы Iwamoto и соавт. [27], а также Bernardi и соавт. [28] посвящены выявлению связи между концентрацией хитиназа-3-подобного белка (CHI3L1; YKL-40) в сыворотке крови пациентов с глиомами и ключевыми показателями, такими как выживаемость и наличие радиологических признаков опухоли. Обе группы авторов выявили ассоциацию между более высокими концентрациями белка YKL-40 в сыворотке и меньшей выживаемостью. Кроме того, более высокие концентрации YKL-40 были ассоциированы с наличием радиологических

признаков опухоли у пациентов с ГБМ и анапластической глиомой. В результате проведенных исследований данный белок был предложен авторами в качестве перспективного прогностического биомаркера. Показано, что YKL-40 играет роль в васкуляризации опухолевой ткани, стимулируя ангиогенез и васкулогенную мимикрию, опосредованные фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецептором (VEGFR 2) [29–31]. Тесная связь YKL-40 с васкуляризацией опухоли обуславливает интерес исследователей к данному белку как к потенциальному прогностическому фактору и терапевтической мишени. Повышенная концентрация этого белка в плазме крови ассоциирована со сниженной выживаемостью пациентов, прошедших терапию бевацизумабом [32]. Кроме того, показано, что применение анти-YKL-40 антител в комплексе с ионизирующим излучением снижает васкуляризацию и пролиферацию опухоли и повышает выживаемость модельных животных [33].

Lin и соавт. [34] оценивали диагностическую и прогностическую значимость белков TIMP-1 (тканевой ингибитор металлопротеиназ 1) и MMP-9 (матриксная металлопротеиназа 9) в плазме крови пациентов с применением ИФА. По результатам исследований TIMP-1 был предложен в качестве потенциального биомаркера ГБМ, поскольку его количественное содержание в плазме крови пациентов было ассоциировано с такими параметрами, как стадия заболевания и выживаемость пациентов. Ramachandran и соавт. исследовали содержание белков MMP-2 и TIMP-1 в биоптатах ткани ГБМ с применением иммуногистохимических методов [35]. Исследователи показали, что более высокие соотношения MMP-2/TIMP-1 были ассоциированы с менее благоприятным прогнозом, что говорит в пользу диагностического потенциала TIMP-1. Однако стоит отметить, что в работе Aaberg-Jessen и соавт. не было выявлено значимых различий в концентрации TIMP-1 в плазме крови пациентов с ГБМ и здоровых людей [36]. Так или иначе, для TIMP-1 и родственных белков была показана способность подавлять миграцию клеток ГБМ *in vitro*, что говорит о возможном нарушении регуляции его активности в ходе развития ГБМ [37].

“Протеомный” подход с применением панели из 656 антител был также использован для выявления кандидатных белковых биомаркеров ГБМ в плазме крови [38]. В плазме пациентов с ГБМ исследователи идентифицировали три белка с повышенным содержанием (FTL, GNAO1 и S100A9) и восемь белков с пониженным содержанием (FADD, CDKN1B, ICAM1, MLH1, MMP11, POLG, SKP1, ST8SIA1) по сравнению со здоровыми донорами. Функциональная аннотация выявленных белков показала, что они вовлечены в такие процессы, как T-клеточный сигналинг, иммунный ответ, адгезия и миграция клеток, контроль клеточного цикла и апоптоз. Примечательно также, что среди выявленных белков повышенная концентрация GNAO1 ( $\alpha$ -субъединицы белка, связывающего гуаниновые

нуклеотиды G(o)) была значимо ассоциирована с более длительной выживаемостью пациентов (> 365 дней). Примечательно, что ассоциация между повышенной концентрацией GNAO1 в ткани опухоли и более благоприятным прогнозом была показана для гепатоцеллюлярной карциномы [39]. В качестве возможного механизма действия данного белка можно предложить индукцию нейрональной дифференцировки опухолевых стволовых клеток, которая была показана в работе Sun и соавт. [40].

### 1.2. Поиск белковых маркеров ГБМ с использованием масс-спектрометрических подходов

Одной из особенностей масс-спектрометрических методик, отличающих их от иммунохимических подходов, является возможность проведения панорамного протеомного анализа, не ограничивающего исследователя конкретным набором или панелью исследуемых белков, что вносит дополнительную степень свободы в поиске потенциальных биомаркеров заболевания [41, 42].

Такого рода анализ сыворотки крови пациентов с ГБМ, проведенный Gollapalli и соавт. [43], показал количественные различия для 55 белков между образцами, полученными от пациентов с ГБМ и от здоровых людей. Среди данного набора значимые количественные различия были подтверждены методом Вестерн-блота для четырех белков: HP, CP, RBP4 и HPX. Функциональная аннотация с использованием инструментов DAVID, PANTHER и IPA показала, что количественно различающиеся белки вовлечены, в том числе, в каскады комплемента и коагуляции, а также сигналинг иммунной системы.

Поиск протеомных маркеров ГБМ в образцах плазмы крови пациентов был проведен Miyauchi и соавт. [44] с применением панорамного SWATH-MS анализа и направленного масс-спектрометрического анализа для абсолютной количественной оценки белков. SWATH-MS анализ был проведен с использованием спектральной библиотеки, созданной по результатам анализа (DDA) цельных и фракционированных образцов плазмы крови и опухолевой ткани, а также кистозной жидкости, полученных от пациентов с ГБМ. В результате были идентифицированы пять белков (LRG1, C9, CRP, SERPINA3, APOB), содержание которых в образцах плазмы крови пациентов с ГБМ по сравнению со здоровыми донорами было повышено, и три белка (GSN, IGHA1, APOA4), содержание которых было снижено. По результатам направленного масс-спектрометрического анализа, значимость отличий в содержании была подтверждена для белков LRG1, C9 и SERPINA3, а также для GSN, IGHA1 и APOA4. Кроме того, исследователями была показана положительная корреляция между концентрациями белков LRG1, C9 и CRP в плазме и размером опухоли, а также между концентрацией GSN и общей выживаемостью. В своих дальнейших работах исследователи сосредоточили основное внимание на богатом лейцином  $\alpha$ -2-гликопротеине 1 (LRG1). Результаты исследований показали, что содержание

этого белка значимо повышено в ткани ГБМ по сравнению с глиомами более низких степеней злокачественности [45]. Кроме того, LRG1 подавлял инвазию опухолевых клеток *in vitro*, а также был ассоциирован с перитуморальным воспалением, что коррелировало с псевдопрогрессией опухоли [46].

В исследовании Kumar и соавт. было показано повышенное содержание  $\alpha 2$  цепи гаптоглобина (HP) в сыворотке пациентов с ГБМ по сравнению со здоровыми людьми. Данный белок влиял на миграцию клеток глиомы *in vitro*, и повышение его содержания стимулировало рост опухоли и снижало выживаемость в мышинных моделях [47]. Некоторые исследователи при рассмотрении гаптоглобина в качестве потенциального маркера ГБМ особое внимание уделяют количественному содержанию различных протеоформ данного белка в плазме крови пациентов, отмечая, в частности, одну из протеоформ непероцессированного гаптоглобина (зонулина) в качестве потенциального биомаркера [48, 49].

Исследования, проведённые на образцах сыворотки пациентов с различными типами глиом, показали, что пониженные концентрации белка фетуина (AHSG) в сыворотке крови пациентов ассоциированы с меньшей выживаемостью, в связи с чем данный белок может быть использован для прогнозирования течения заболевания. Несмотря на то, что AHSG вовлечён в сигнальные пути, участвующие в процессах роста и инвазии ГБМ [50], авторы отмечают, что отдельно взятый AHSG не может рассматриваться как биомаркер, специфичный для ГБМ, поскольку его концентрация в сыворотке крови снижена и у пациентов с другими патологиями головного мозга, а также у пациентов с новообразованиями, не происходящими из центральной нервной системы [51]. В работе Petushkova и соавт. AHSG, идентифицированный в плазме крови больных ГБМ и здоровых людей, рассматривался в контексте посттрансляционных модификаций [52]. Исследователи показали, что один из продуктов триптического гидролиза AHSG — пептид, содержащий фосфорилированный треонин-158 — был детектирован в образцах, полученных от пациентов с ГБМ, но не обнаруживался в плазме крови здоровых людей.

Стоит, однако, отметить, что рассмотренные ранее белки HV, YKL-40 и AHSG были исследованы в работе van Linde и соавт., результаты которой не подтвердили связь между концентрациями данных белков в крови и прогнозом заболевания [53].

Протеомные подходы с использованием масс-спектрометрических методов в общем случае позволяют проводить поиск и количественную оценку потенциальных биомаркеров среди тысяч идентифицированных белков в биологических образцах. Однако они имеют существенные ограничения при анализе таких сложных биопроб, как сыворотка и плазма крови. Эти ограничения связаны с низкой концентрацией клинически значимых белков в сочетании с широким динамическим диапазоном протеома плазмы крови

(более десяти порядков [54]), отчасти обусловленным присутствием в материале так называемых мажорных белков. Одним из наиболее технически простых решения данной проблемы является деплеция мажорных белков из образцов плазмы или сыворотки крови с использованием коммерческих наборов. Подобный метод был использован в работе Gautam и соавт. [55], в которой shotgun-анализ пулированных образцов плазмы крови, полученных от пациентов с ГБМ и здоровых доноров, позволил идентифицировать набор из 61 количественно различающегося белка. Функциональная аннотация показала наличие в наборе белков острой фазы, а также участников каскадов комплемента и коагуляции. Кроме того, значимые количественные различия трёх белков (FTL, S100A9 и CNDP1) были подтверждены с использованием ИФА на индивидуальных образцах плазмы крови, полученных от пациентов с ГБМ и здоровых доноров. Среди них особый интерес представляет кальций-связывающий белок S100-A9 (S100A9), стимулирующий миграцию и пролиферацию клеток ГБМ *in vitro*, а также опосредующий миграцию противовоспалительных M2 макрофагов, вносящих вклад в формирование иммуносупрессорного микроокружения опухоли [56]. Перечень потенциальных циркулирующих биомаркеров ГБМ, отмеченных в рассмотренных работах, приведён в таблице 1. Преобладание среди количественно различающихся белков, приведённых в данных работах, участников каскадов комплемента, коагуляции и сигналинга в иммунной системе может говорить об особенностях молекулярных взаимодействий опухоли с ключевыми системами организма. Однако такие результаты в совокупности со сравнительно небольшим числом идентифицированных белков в приведённых работах (около 200–300) могут также указывать на проблему ограниченной чувствительности масс-спектрометрических методов при анализе плазмы и сыворотки крови, которая остаётся актуальной даже при деплеции мажорных белков.

## 2. БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ В СОСТАВЕ ВнВ

Для решения обозначенной выше проблемы исследователи всё чаще прибегают к обогащению исследуемого материала низкокопийными белками за счёт выделения ВнВ. ВнВ представляют собой ограниченные липидным бислоем структуры, секретлируемые всеми живыми клетками организма и представленные двумя субпопуляциями: отделяемые от плазматической мембраны микровезикулы, имеющие диаметр 100–1000 нм, и образующиеся при впячивании эндосомальной мембраны экзосомы, имеющие диаметр 40–150 нм [57]. ВнВ выступают привлекательным объектом для поиска белковых профилей, ассоциированных с различными заболеваниями, так как секретируются всеми живыми клетками организма и отражают их молекулярный состав, а также представлены в биологических жидкостях [58]. По литературным данным, ВнВ вовлечены в такие процессы, как клеточный ответ на стресс, регенерация тканей, а также

## ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Таблица 1. Потенциальные свободные белковые маркеры ГБМ, идентифицированные в плазме и сыворотке крови человека. Жирным шрифтом выделены белки, отмеченные в нескольких независимых исследованиях

Белки		Материал	Метод исследования	Ссылка
VEGF, IL-8	Ассоциированы с наличием ГБМ	Плазма	Иммунофлуоресцентный анализ (панели <i>scFv</i> )	[17]
IL-12, IFN- $\gamma$	Ассоциированы с большей выживаемостью			
BMP2, CXCL10, HSP70	Ассоциированы с наличием ГБМ	Сыворотка	Иммуноферментный анализ	[23]
TSP1, IGFBP3, HSP70	Ассоциированы с выживаемостью			
GFAP	Ассоциирован с наличием ГБМ	Плазма	Иммуноферментный анализ	[24–26]
<b>HP</b>	Ассоциирован с наличием ГБМ	Сыворотка	Масс-спектрометрия (MALDI-TOF), иммуноферментный анализ	[47]
<b>YKL-40</b>	Ассоциирован с меньшей выживаемостью	Сыворотка	Иммуноферментный анализ	[27, 28]
AHSG	Ассоциирован с большей выживаемостью	Сыворотка	Масс-спектрометрия (MALDI-TOF), иммуноферментный анализ	[51]
TIMP-1	Ассоциирован со стадией заболевания и выживаемостью	Плазма	Иммуноферментный анализ	[34]
<b>FTL, GNAO1, S100A9</b>	Количественно повышены у пациентов с ГБМ <i>GNAO1</i> ассоциирован с большей выживаемостью	Плазма	Иммунофлуоресцентный анализ	[38]
FADD, CDKN1B, ICAM1, MLH1, MMP11, POLG, SKP1, ST8SIA1	Количественно понижены у пациентов с ГБМ			
<b>HP, CP, RBP4</b>	Количественно повышены у пациентов с ГБМ	Сыворотка	Масс-спектрометрия (MALDI-TOF), иммунотурбидиметрия, иммуноблот	[43]
HPX	Количественно понижены у пациентов с ГБМ			
LRG1, C9, SERPINA3	Количественно повышены у пациентов с ГБМ	Плазма	Масс-спектрометрия (SWATH-MS, QTAP)	[44]
GSN, IGHA1, APOA4	Количественно понижены у пациентов с ГБМ			
LRG1, C9, CRP	Ассоциированы с размером опухоли			
GSN	Ассоциированы с выживаемостью			
Набор из 61 белка, включая <b>FTL, S100A9, CNDP1</b>		Плазма	Масс-спектрометрия (iTRAQ DDA), иммуноферментный анализ	[55]

иммунные реакции [59–61]. Показана также роль ВнВ в возникновении, развитии и метастазировании опухолей [62–65]. Кроме того, показано, что даже в здоровой ткани мозга ВнВ способны проникать через ГЭБ, сформированный клетками эндотелия сосудов, перицитами, а также отростками астроцитов [66, 67], в то время как клетки злокачественных опухолей характеризуются повышенной секрецией ВнВ по сравнению со здоровыми клетками организма [68]. Эти факторы делают ВнВ перспективным биологическим материалом для исследования молекулярных процессов, лежащих в основе различных заболеваний. В свете повышенного интереса научного сообщества к ВнВ как к перспективному материалу для исследования протеомных профилей, сопряжённых с различными заболеваниями, особое внимание в мировой литературе уделяется методам выделения ВнВ и применимости этих методов к разным типам биологического

материала [69–73]. Актуальными на сегодняшний день методами выделения фракции ВнВ являются преципитация с использованием гидрофильных полимеров, ультрафильтрация, дифференциальное ультрацентрифугирование, ультрацентрифугирование в градиенте плотности, эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация), а также иммуноаффинные методы [74].

### 2.1. Поиск ВнВ-ассоциированных маркеров ГБМ *in vitro*

При исследовании ГБМ модельными объектами часто выступают линии клеток, используемые для выделения фракции ВнВ и характеристики её протеома. В качестве примера можно привести работу Lane и соавт. [75], в которой для выделения ВнВ из культуральной жидкости были использованы различные клеточные линии ГБМ, представляющие разные типы опухолевых клеток (в частности, LN18, U118, U87), а также линии опухолевых

стволовых клеток G166 и GS090. Протеомный анализ ВнВ позволил разделить исследуемые линии на две группы: LN18, U87 и U118 с одной стороны и G166 и GS090 — с другой. При этом, в линиях опухолевых стволовых клеток G166 и GS090 анализ обогащения протеома выделил функциональные группы белков, связанных с нормальным метаболизмом, в то время как для других линий преобладали группы, связанные с клеточным сигналингом, ассоциированным с прогрессией ГБМ. Кроме того, во фракции ВнВ, выделенной *in vitro* из наиболее инвазивных линий ГБМ LN18 и U87, были идентифицированы белки WNT5a, TGFBI, SERPINE1 и GDF-15, предложенные авторами в качестве потенциальных маркеров злокачественности. В других исследованиях было показано, что повышенное содержание WNT5a в первичных клеточных линиях ГБМ было ассоциировано с более инфильтративным поведением клеток [76]. Для кератоэпителина (TGFBI) показана роль в индукции пролиферации и миграции клеток ГБМ *in vitro* и *in vivo*, а также в формировании резистентности к темозоломиду [77–79]. Ингибитор активатора плазминогена (SERPINE1) входит в число проангиогенных белков, чьё содержание в ГБМ повышается в ответ на гипоксию [80]. Фактор роста и дифференцировки 15 (GDF-15) ассоциирован с усиленной миграцией и инвазией клеток ГБМ, а также с резистентностью к радиотерапии [81, 82].

Сходное по дизайну исследование было проведено Nagyshny и соавт. [83] с тем отличием, что основная цель исследователей состояла в поиске потенциальных белковых маркеров, общих для нескольких исследуемых клеточных линий ГБМ: Glia-Sh, Glia-L, A172, Glia-R и Glia-Tr. Среди 896 идентифицированных белков 133 были общими для всех пяти клеточных линий. 15 из этих белков были предложены авторами в качестве “потенциальных экзосомных маркеров ГБМ” (ANXA1, ANXA2, ENOA, G3P, HS90B, KPYM, PRDX1, TPIS, TERA, VIME, 1433E, COF1, NPM, CD44, TNC). Примечательно, что 13 из них ранее были идентифицированы авторами в полноклеточном протеоме культур клеток ГБМ и отличали их от здоровых клеток, в качестве которых были использованы перевиваемые культуры фибробластов человека [84].

## 2.2. Поиск ВнВ-ассоциированных маркеров ГБМ на животных моделях

Несмотря на удобство использования моделей ГБМ *in vitro*, результаты исследований с использованием *in vivo* моделей имеют более высокую релевантность. В связи с этим в ряде работ предпочтение отдаётся мышинным моделям. Примером таких работ является исследование Anastasi и соавт., проведённое с использованием мышинной модели ГБМ [85]. В ходе работы в образцах ВнВ, выделенных из сыворотки крови мышей на разных стадиях развития заболевания, было идентифицировано 274 белка. Существенная доля белков, отличающих мышей с ГБМ от здоровых

животных, вовлечена в связывание антигенов, протеаз, интегринов и др. Исследователи идентифицировали набор из 25 белков, для которых наблюдалось значимое отличие в содержании в образцах, полученных от мышей с ГБМ. В частности, к ним отнесены белки Lrp1, Cpn1, Mhy9 и Tln1, вовлечённые в процессы инвазии и метастазирования опухолей, Angpt1, Vtn, Vcan, участвующие в клеточной адгезии, а также в индукции ангиогенеза, пролиферации и выживания клеток через сигнальный путь PI3K/Akt. Более поздняя работа этого коллектива исследователей включала протеомный анализ трёх типов биологического материала, полученного от модельных животных в разные временные точки (включая период до индукции ГБМ и период развития заболевания): сыворотка крови, выделенная из неё фракция ВнВ, а также цереброспинальная жидкость (ЦСЖ). Интерес представляет сравнение протеома первых двух типов образцов, в результате которого во фракции ВнВ были идентифицированы 99 белков, не обнаруженные при протеомном анализе сыворотки. Содержание 19 белков, идентифицированных в образцах ВнВ, повышалось с развитием заболевания, причём для них показано участие в процессах, сопряжённых с развитием онкологических заболеваний: клеточная подвижность, инвазия, пролиферация и ангиогенез. Шесть из этих белков (Tln1, Mhy9, Thbs1, Flna, Vcan, Lamb1) ранее были идентифицированы во ВнВ, выделенных из клеточных линий ГБМ человека [86].

## 2.3. Поиск ВнВ-ассоциированных маркеров ГБМ в клиническом материале

Несмотря на широкое распространение масс-спектрометрических методик в исследовании белкового состава ВнВ, иммунохимические методы также находят применение в поиске ВнВ-ассоциированных биомаркеров ГБМ. Примером является работа Chandran и соавт., в которой ВЭЖХ-МС анализ и иммунопрофилирование ВнВ плазмы крови использовали для идентификации потенциальных биомаркеров, позволяющих отличить ГБМ от глиом более низких степеней злокачественности. В результате анализа белок синдекан 1 (SDC1) был выявлен в качестве потенциального ВнВ-ассоциированного маркера, позволяющего различить глиомы IV и II степени злокачественности [87]. В других исследованиях SDC1 был выявлен в качестве маркера неблагоприятного прогноза [88], а также показано его участие в формировании радиорезистентности клеток ГБМ [89, 90].

Работа Osti и соавт. [91] выделяется не только использованием плазмы крови пациентов с ГБМ в качестве объекта исследования, но и включением в эксперимент образцов, полученных от здоровых людей и пациентов с другими типами опухолей мозга (вторичные опухоли, аденомы, менингиомы, невриномы). По результатам исследования количество ВнВ в материале, полученном от пациентов с ГБМ, было существенно выше такового у здоровых людей и пациентов с другими типами опухолей мозга. Важно отметить,

что количество ВнВ в плазме крови не зависит от размера опухоли, но зависит от степени некроза ткани ГБМ. Источником повышенного содержания ВнВ в крови является опухолевая ткань, о чём свидетельствует показанное в этом же исследовании снижение количества ВнВ в образцах пациентов после удаления опухоли. Это подтверждается также результатами проведённой авторами ортотопической трансплантации стволовых клеток ГБМ лабораторным животным, после которой приблизительно половину ВнВ, циркулирующих в крови лабораторных животных, составляли ВнВ опухолевого происхождения. Масс-спектрометрический протеомный анализ позволил идентифицировать наборы белков с количественными различиями между образцами, полученными от пациентов с ГБМ и здоровых людей. По результатам анализа был выявлен набор из 19 белков, демонстрирующих повышенное содержание в образцах пациентов с ГБМ и вовлечённых в развитие воспаления, иммунных реакций, а также рост и миграцию клеток. Для определения влияния ткани ГБМ на протеом ВнВ плазмы крови был проведён сравнительный анализ образцов, полученных до и после удаления новообразования, позволивший идентифицировать набор из 102 количественно различающихся белков. По результатам сравнения данных наборов были идентифицированы 11 общих белков (vWF, APC5, C4B, AMBP, APOD, AZGP1, C4BPB, SERPIN3, FTL, C3, APOE), вовлечённых в систему комплемента (участники которой рассматриваются в качестве потенциальных терапевтических мишеней и прогностических факторов [92]), каскады коагуляции, а также регуляцию метаболизма железа.

Hallal и соавт. [93] провели поиск потенциальных маркеров ГБМ во ВнВ из плазмы крови пациентов. Исследователи идентифицировали 463 белка, количественно различающихся в различных гистологических подтипах глиом (ГБМ, астроцитомы, олигодендроглиомы), и 310 белков с отличиями в содержании у глиом различной степени злокачественности (II–IV). При этом 11 белков были обнаружены исключительно в образцах, полученных от пациентов с ГБМ: AIDA, ARHGEF10, BNIP3L, FYB1, KMT2D, MAP7, MAST4, PDE8A, POLR2D, RENBP и SLC25A17. Данный набор белков, а также белки CETN3, PPP1R11 и SYT7 были идентифицированы исключительно в образцах, полученных от пациентов с глиомой четвёртой степени злокачественности. Кроме того, по сравнению с контрольными группами (здоровые доноры и пациенты с менингиомами) выявлены количественные различия у 68 белков в образцах, полученных от пациентов с ГБМ, а содержание 2 белков (EBNA1BP2 и FAM129A) различалось во всех гистологических подтипах глиом. Авторы отмечают, что идентифицированный набор белков демонстрирует пересечение с представленным ранее в литературе набором из 145 “сигнаурных ВнВ-ассоциированных белков ГБМ”, идентифицированным в нескольких клеточных линиях ГБМ [94]. Среди данных “сигнаурных” белков 10 количественно различались

в образцах, полученных от пациентов с ГБМ, по сравнению с контрольными группами: PSAP, CALR, PLOD3, HSPA4, GANAB, LGALS3BP, CCT2, PPIA, C3 и KRT10. Результаты более поздних исследований показали, что белок Niban 1 (FAM129A) играет роль в самообновлении опухолевых стволовых клеток, а также стимулирует их миграцию и инвазию посредством регуляции сигнального каскада Notch [95]. Рассмотренные в разделе работы демонстрируют взаимное пересечение различных подходов к выявлению потенциальных белковых маркеров ГБМ, ассоциированных с ВнВ. Потенциальные маркеры, отмеченные в данных работах, приведены в таблице 2.

### 3. ПЕРСПЕКТИВЫ СВОБОДНЫХ И ВнВ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ

Поиск потенциальных ВнВ-ассоциированных белковых маркеров заболеваний в жидких средах организма представляет собой более комплексную задачу по сравнению с обнаружением свободно циркулирующих биомаркеров. В то же время такой подход имеет ряд существенных преимуществ. Ключевым из них является повышение чувствительности протеомного анализа, что позволяет увеличить детектируемый сегмент протеома за счёт низкокопийных белков. Исследования, проведённые ранее в нашей лаборатории, показали, что масс-спектрометрический анализ фракции ВнВ, выделенных из сыворотки крови, позволяет идентифицировать примерно в 1,8 раза больше белков (141) по сравнению с цельной сывороткой (78) [96]. Такое расширение диапазона детектируемых белков может позволить, в том числе, повысить специфичность выявленных биомаркеров. По определению Национального института онкологии биомаркером является “биологическая молекула, обнаруженная в крови, других жидкостях организма или тканях, и являющаяся признаком нормального или абнормального процесса либо состояния, или заболевания” [97]. Таким образом, маркером можно считать как молекулы, продуцируемые опухолевыми клетками, так и молекулы, синтезируемые организмом в рамках реакции на наличие новообразования. Выделение ВнВ расширяет возможности поиска маркеров, специфически продуцируемых опухолью, и делает более оправданным подход, включающий предварительный поиск таких белков в клеточных или животных моделях. Для ГБМ такой подход был реализован в ряде работ, рассмотренных ранее [91, 93]. Ранее в нашей лаборатории были проведены сходные по дизайну исследования, нацеленные на поиск ВнВ-ассоциированных белковых маркеров аденокарциномы лёгкого и колоректального рака [98–100]. В рамках одного из этих исследований удалось идентифицировать 28 ВнВ-ассоциированных белков, продуцируемых клеточными линиями аденокарциномы лёгкого NCI-H23 и A549 [98]. Среди них талин-1 (TLN1), тубулин  $\alpha$ -4A (TUBA4A) и 70 кДа белок теплового шока 8 (HSPA8) были выделены, как белки с наибольшим диагностическим потенциалом.

Таблица 2. Потенциальные ВнВ-ассоциированные белковые маркеры ГБМ человека. Жирным шрифтом выделены белки, отмеченные в нескольких исследованиях, цветом выделены белки, выявленные как в животных моделях, так и в человеческом материале

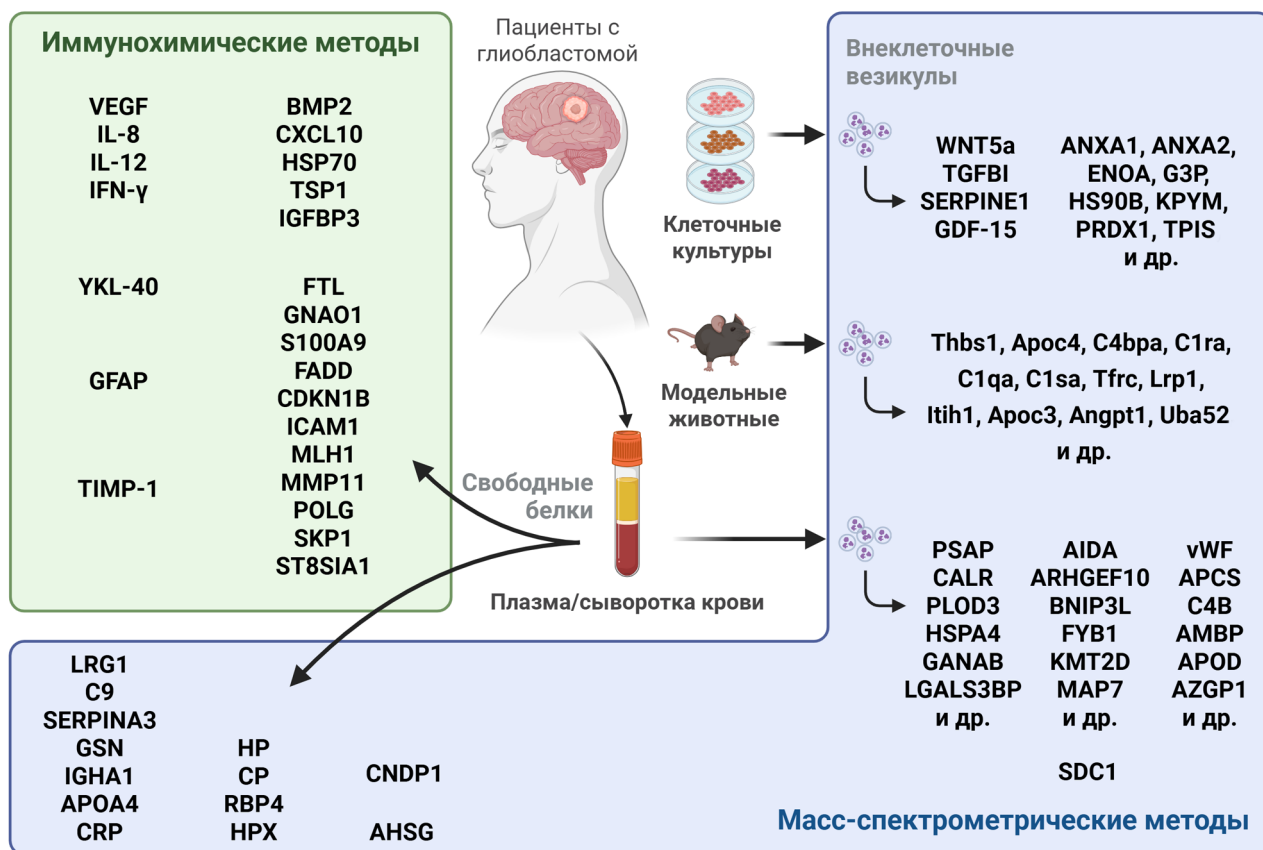
Белки	Объект исследования	Метод исследования	Ссылка
WNT5a, TGFBI, SERPINE1, GDF-15	Ассоциированы с инвазивностью опухоли	Человеческие клеточные линии (LN18, U87 и др.)	Масс-спектрометрия [75]
<b>ANXA1, ANXA2, ENOA, G3P, HS90B, KPYM, PRDX1, TPIS, TERA, VIME, 1433E, COF1, NPM, CD44, TNC</b>	Общие белковые маркеры для нескольких клеточных линий ГБМ	Человеческие клеточные линии (Glia-Sh, Glia-L, A172 и др.)	Масс-спектрометрия [83, 84]
<b>Thbs1, Apc4, C4bpa, C1ra, C1qa, C1sa, Tfrc, Lrp1, Itih1, Apc3, Angpt1, Uba52, Pm20d, Itga2b, Myh9, Cpn1, Vtn, Itih3, Glul, Tln1, Fbln1, Vcan, Flna, Lamb1, Pcyox1</b>	Ассоциированы с наличием ГБМ у модельных животных	Мышиные модели (ВнВ из сыворотки)	Масс-спектрометрия (DDA) [85]
<b>Thbs1, C4bpa, C1ra, C1qa, C1sa, Tfrc, Lrp1, Itih1, Uba52, Itga2b, Myh9, Vtn, Glul, Tln1, Fbln1, Vcan, Flna, Lamb1, Pcyox1</b>	Ассоциированы с развитием заболевания у модельных животных	Мышиные модели (ЦСЖ, сыворотка, ВнВ из сыворотки)	Масс-спектрометрия (DDA) [86]
SDC1	Маркер, отличающий ГБМ от глиом более низких стадий	Клинические образцы (плазма крови)	Масс-спектрометрия, ИФА и иммунофлуоресцентный анализ [87]
vWF, APCS, C4B, AMBP, APOD, AZGP1, C4BPB, SERPIN3, FTL, C3, APOE	Ассоциированы с наличием ГБМ, отличают пациентов с ГБМ от пациентов с другими опухолями мозга	Клинические образцы (плазма крови)	Масс-спектрометрия (DDA) [91]
AIDA, ARHGEF10, BNIP3L, FYB1, KMT2D, MAP7, MAST4, PDE8A, POLR2D, RENBP, SLC25A17	Обнаружены исключительно в материале, полученном от пациентов с ГБМ	Клинические образцы (плазма крови)	Масс-спектрометрия (SWATH-MS) [93]
PSAP, CALR, PLOD3, HSPA4, GANAB, LGALS3BP, CCT2, PPIA, C3, KRT10	Количественно различались в образцах от пациентов ГБМ по сравнению со здоровыми донорами		

Содержание белка TLN1 было повышено в образцах плазмы крови от пациентов с новообразованиями лёгких по сравнению с контрольной группой, а белки TUBA4A и HSPA8 были идентифицированы исключительно в образцах, полученных от пациентов с новообразованиями. Кроме того, полученная протеомная сигнатура позволяет различить образцы, полученные от пациентов с аденокарциномой лёгкого и плоскоклеточной карциномой ( $AUC \geq 0,88$ ). Сходный набор белков был идентифицирован в работе, посвящённой поиску ВнВ-ассоциированных биомаркеров колоректального рака *in vitro* и в клинических образцах плазмы крови с тем отличием, что белки TLN1, ITGB3 и TUBA4A были количественно снижены, а белок перлекан (HSPG2) повышен в образцах, полученных от пациентов с колоректальным раком, по сравнению с образцами контрольной группы [99].

Таким образом, как литературные данные, так и опыт нашей лаборатории показывают перспективность исследования ВнВ как потенциального источника белковых биомаркеров онкологических заболеваний, в частности, опухолей нервной системы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ существующих на сегодняшний день исследований позволяет заключить, что поиск циркулирующих белковых биомаркеров ГБМ является динамично развивающимся направлением, привлекающим внимание исследователей. Результаты рассмотренных исследований графически отражены на рисунке 1. Полученные в исследованиях данные позволяют говорить о теоретической применимости протеомного профилирования плазмы и сыворотки крови для решения задач диагностики,



**Рисунок 1.** Основные пути поиска циркулирующих белковых маркеров глиобластомы и полученные на сегодняшний день результаты. Названия белков приведены в соответствии с генетической номенклатурой.

прогнозирования течения заболевания и, возможно, контроля ответа ГБМ на терапию. При этом анализ белков, ассоциированных с ВнВ, представляется перспективным ответвлением данного направления исследований, поскольку позволяет хотя бы частично преодолеть ограничения, связанные с низкой концентрацией клинически значимых белков и высоким динамическим диапазоном плазмы крови. В работах, анализирующих ВнВ, идентифицированы наборы белков, многие из которых вовлечены в ключевые процессы онкогенеза, такие как инвазия, ангиогенез и иммунный ответ [85, 91, 93]. В то же время, отсутствие единых стандартов выделения ВнВ и валидации биомаркеров в крупных независимых когортах остается серьезным вызовом. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения специфичности выявленных белковых маркеров и их диагностической ценности. Тем не менее, интеграция протеомных подходов в парадигму жидкостной биопсии обладает значительным потенциалом для возможного внедрения в клиническую практику.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Собственные результаты исследований, приведённые в данной работе, получены с использованием оборудования и ресурсов ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Grochans S., Cybulska A.M., Simińska D., Korbecki J., Kojder K., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. (2022) Epidemiology of glioblastoma multiforme. *Cancers (Basel)*, **14**(10), 2412. DOI: 10.3390/cancers14102412
2. Hanif F., Muzaffar K., Perveen K., Malhi S.M., Simjee S.U. (2017) Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **18**(1), 3–9. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3

3. Tan A.C., Ashley D.M., López G.Y., Malinzak M., Friedman H.S., Khasraw M. (2020) Management of glioblastoma: state of the art and future directions. *CA Cancer J. Clin.*, **70**(4), 299–312. DOI: 10.3322/caac.21613
4. Ahmed R., Oborski M.J., Hwang M., Lieberman F.S., Mountz J.M. (2014) Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Manag. Res.*, **24**(6), 149–170. DOI: 10.2147/CMAR.S54726
5. Ronvaux L., Riva M., Coosemans A., Herzog M., Rommelaere G., Donis N., d'Hondt L., Douxfils J. (2022) Liquid biopsy in glioblastoma. *Cancers (Basel)*, **14**(14), 3394. DOI: 10.3390/cancers14143394
6. Gilard V., Tebani A., Dabaj I., Laquèrriure A., Fontanilles M., Derrey S., Marret S., Bekri S. (2021) Diagnosis and management of glioblastoma: a comprehensive perspective. *J. Pers. Med.*, **11**(4), 258. DOI: 10.3390/jpm11040258
7. Seyhan A.A. (2024) Circulating liquid biopsy biomarkers in glioblastoma: advances and challenges. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**(14), 7974. DOI: 10.3390/ijms25147974
8. Eibl R.H., Schneemann M. (2023) Liquid biopsy and glioblastoma. *Explor. Target Antitumor Ther.*, **4**(1), 28–41. DOI: 10.37349/etat.2023.00121
9. Jones J., Nguyen H., Drummond K., Morokoff A. (2021) Circulating biomarkers for glioma: a review. *Neurosurgery*, **88**(3), E221–E230. DOI: 10.1093/neuros/nyaa540
10. Mo F., Pellerino A., Soffietti R., Rudà R. (2021) Blood-brain barrier in brain tumors: biology and clinical relevance. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(23), 12654. DOI: 10.3390/ijms222312654
11. Constanzo F., Teixeira B.C.A., Sens P., Smaili H., Escuissato D.L., Ramina R. (2023) Perfusion-weighted imaging in vestibular schwannoma: the influence that cystic status and tumor size have on perfusion profiles. *Radiol. Bras.*, **56**(2), 67–74. DOI: 10.1590/0100-3984.2022.0035
12. Wu S.-K., Tsai C.-L., Huang Y., Hynynen K. (2021) Focused ultrasound and microbubbles-mediated drug delivery to brain tumor. *Pharmaceutics*, **13**(1), 15. DOI: 10.3390/pharmaceutics13010015
13. Arvanitis C.D., Ferraro G.B., Jain R.K. (2020) The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer*, **20**(1), 26–41. DOI: 10.1038/s41568-019-0205-x
14. Upton D.H., Ung C., George S.M., Tsoli M., Kavallaris M., David S. (2022) Challenges and opportunities to penetrate the blood-brain barrier for brain cancer therapy. *Theranostics*, **12**(10), 4734–4752. DOI: 10.7150/thno.69682
15. Digiovanni S., Lorenzati M., Bianciotto O.T., Godel M., Fontana S., Akman M., Costamagna C., Couraud P.-O., Buffo A., Kopecka J., Riganti C., Salaroglio I.C. (2024) Blood-brain barrier permeability increases with the differentiation of glioblastoma cells *in vitro*. *Fluids Barriers CNS*, **21**, 89. DOI: 10.1186/s12987-024-00590-0
16. Solier C., Langen H. (2014) Antibody-based proteomics and biomarker research — current status and limitations. *Proteomics*, **14**(6), 774–783. DOI: 10.1002/pmic.201300334
17. Carlsson A., Persson O., Ingvarsson J., Widegren B., Salford L., Borrebaeck C.A.K., Wingren C. (2010) Plasma proteome profiling reveals biomarker patterns associated with prognosis and therapy selection in glioblastoma multiforme patients. *Proteomics Clin. Appl.*, **4**(6–7), 591–602. DOI: 10.1002/prca.200900173
18. Ahir B.K., Engelhard H.H., Lakka S.S. (2020) Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: glioblastoma. *Mol. Neurobiol.*, **57**(5), 2461–2478. DOI: 10.1007/s12035-020-01892-8
19. Xu C., Wu X., Zhu J. (2013) VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2. *Sci. World J.*, **2013**, 417413. DOI: 10.1155/2013/417413
20. Meier C., Brieger A. (2025) The role of IL-8 in cancer development and its impact on immunotherapy resistance. *Eur. J. Cancer*, **218**, 115267. DOI: 10.1016/j.ejca.2025.115267
21. McClelland S., Maxwell P.J., Branco C., Barry S.T., Eberlein C., LaBonte M.J. (2024) Targeting IL-8 and its receptors in prostate cancer: inflammation, stress response, and treatment resistance. *Cancers (Basel)*, **16**(16), 2797. DOI: 10.3390/cancers16162797
22. Urbantat R.M., Vajkoczy P., Brandenburg S. (2021) Advances in chemokine signaling pathways as therapeutic targets in glioblastoma. *Cancers (Basel)*, **13**(12), 2983. DOI: 10.3390/cancers13122983
23. Elstner A., Stockhammer F., Nguyen-Dobinsky T.-N., Nguyen Q.L., Pilgermann I., Gill A., Guhr A., Zhang T., von Eckardstein K., Picht T., Veelken J., Martuza R.L., von Deimling A., Kurtz A. (2011) Identification of diagnostic serum protein profiles of glioblastoma patients. *J. Neurooncol.*, **102**(1), 71–80. DOI: 10.1007/s11060-010-0284-8
24. Jung C.S., Foerch C., Schänzer A., Heck A., Plate K.H., Seifert V., Steinmetz H., Raabe A., Sitzer M. (2007) Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*, **130**(12), 3336–3341. DOI: 10.1093/brain/awm263
25. Tichy J., Spechtmeyer S., Mittelbronn M., Hattingen E., Rieger J., Senft C., Foerch C. (2015) Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J. Neurooncol.*, **126**(2), 361–369. DOI: 10.1007/s11060-015-1978-8
26. Kiviniemi A., Gardberg M., Frantzen J., Parkkola R., Vuorinen V., Pesola M., Minn H. (2015) Serum levels of GFAP and EGFR in primary and recurrent high-grade gliomas: correlation to tumor volume, molecular markers, and progression-free survival. *J. Neurooncol.*, **124**(2), 237–245. DOI: 10.1007/s11060-015-1829-7
27. Iwamoto F.M., Hottinger A.F., Karimi S., Riedel E., Dantis J., Jahdi M., Panageas K.S., Lassman A.B., Abrey L.E., Fleisher M., DeAngelis L.M., Holland E.C., Hormigo A. (2011) Serum YKL-40 is a marker of prognosis and disease status in high-grade gliomas. *Neuro. Oncol.*, **13**(11), 1244–1251. DOI: 10.1093/neuonc/nor117
28. Bernardi D., Padoan A., Ballin A., Sartori M.T., Manara R., Scienza R., Plebani M., Della Puppa A. (2012) Serum YKL-40 following resection for cerebral glioblastoma. *J. Neurooncol.*, **107**(2), 299–305. DOI: 10.1007/s11060-011-0762-7
29. Shao R. (2013) YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis. *Front. Physiol.*, **4**(122), 122. DOI: 10.3389/fphys.2013.00122
30. Francescone R.A., Scully S., Faibish M., Taylor S.L., Oh D., Moral L., Yan W., Bentley B., Shao R. (2011) Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma. *J. Biol. Chem.*, **286**(17), 15332–15343. DOI: 10.1074/jbc.M110.212514
31. Francescone R., Ngernyuan N., Yan W., Bentley B., Shao R. (2014) Tumor-derived mural-like cells coordinate with endothelial cells: role of YKL-40 in mural cell-mediated

- angiogenesis. *Oncogene*, **33**(16), 2110–2122. DOI: 10.1038/onc.2013.160
32. *Boisen M.K., Holst C.B., Consalvo N., Chinot O.L., Johansen J.S.* (2018) Plasma YKL-40 as a biomarker for bevacizumab efficacy in patients with newly diagnosed glioblastoma in the phase 3 randomized AVAglio trial. *Oncotarget*, **9**(6), 6752–6762. DOI: 10.18632/oncotarget.22886
  33. *Shao R., Francescone R., Ngernyuang N., Bentley B., Taylor S.L., Moral L., Yan W.* (2014) Anti-YKL-40 antibody and ionizing irradiation synergistically inhibit tumor vascularization and malignancy in glioblastoma. *Carcinogenesis*, **35**(2), 373–382. DOI: 10.1093/carcin/bgt380
  34. *Lin Y., Wang J.F., Gao G.Z., Zhang G.Z., Wang F.L., Wang Y.J.* (2013) Plasma levels of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 correlate with diagnosis and prognosis of glioma patients. *Chin. Med. J.*, **126**(22), 4295–4300. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20131765
  35. *Ramachandran R.K., Surensen M.D., Aaberg-Jessen C., Hermansen S.K., Kristensen B.W.* (2017) Expression and prognostic impact of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in astrocytomas. *PLOS One*, **12**(2), e0172234. DOI: 10.1371/journal.pone.0172234
  36. *Aaberg-Jessen C., Halle B., Jensen S.S., Müller S., Rømer U.M., Pedersen C.B., Brünner N., Kristensen B.W.* (2016) Comparative studies of TIMP-1 immunohistochemistry, TIMP-1 FISH analysis and plasma TIMP-1 in glioblastoma patients. *J. Neurooncol.*, **130**(3), 439–448. DOI: 10.1007/s11060-016-2252-4
  37. *Taheri E., Raeeszadeh-Sarmazdeh M.* (2025) Effect of TIMPs and their minimally engineered variants in blocking invasion and migration of brain cancer cells. *Oncotarget*, **16**, 118–130. DOI: 10.18632/oncotarget.28691
  38. *Zupancic K., Blejec A., Herman A., Veber M., Verbovsek U., Korsic M., Knezevic M., Rozman P., Turnsek T.L., Gruden K., Motaln H.* (2014) Identification of plasma biomarker candidates in glioblastoma using an antibody-array-based proteomic approach. *Radiol. Oncol.*, **48**(3), 257–266. DOI: 10.2478/raon-2014-0014
  39. *Du M., Feng J., Tao Y., Pan Q., Chen F.* (2021) GNAO1 as a novel predictive biomarker for late relapse in hepatocellular carcinoma. *J. Healthc. Eng.*, **2021**, 7631815. DOI: 10.1155/2021/7631815
  40. *Sun B., Wang G., Chen G., Zhang Y., Yang R., Hua H., Li Y., Feng H.* (2025) GNAO1 overexpression promotes neural differentiation of glioma stem-like cells and reduces tumorigenicity through TRIM21/CREB/HES1 axis. *Oncogene*, **44**(7), 450–461. DOI: 10.1038/s41388-024-03234-7
  41. *Geyer P.E., Holdt L.M., Teupser D., Mann M.* (2017) Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol. Syst. Biol.*, **13**(9), 942. DOI: 10.15252/msb.20156297
  42. *Rehman S.H., Lim S.M., Neoh C.F., Majeed A.B.A., Chin A.-V., Tan M.P., Kamaruzzaman S.B., Ramasamy K.* (2020) Proteomics as a reliable approach for discovery of blood-based Alzheimer's disease biomarkers: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.*, **60**, 101066. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101066
  43. *Gollapalli K., Ray S., Srivastava R., Renu D., Singh P., Dhali S., Bajpai Dikshit J., Srikanth R., Moiyadi A., Srivastava S.* (2012) Investigation of serum proteome alterations in human glioblastoma multiforme. *Proteomics*, **12**(14), 2378–2390. DOI: 10.1002/pmic.201200002
  44. *Miyauchi E., Furuta T., Ohtsuki S., Tachikawa M., Uchida Y., Sabit H., Obuchi W., Baba T., Watanabe M., Terasaki T., Nakada M.* (2018) Identification of blood biomarkers in glioblastoma by SWATH mass spectrometry and quantitative targeted absolute proteomics. *PLOS One*, **13**(3), e0193799. DOI: 10.1371/journal.pone.0193799
  45. *Furuta T., Sugita Y., Komaki S., Ohshima K., Morioka M., Uchida Y., Tachikawa M., Ohtsuki S., Terasaki T., Nakada M.* (2020) The multipotential of leucine-rich  $\alpha$ -2 glycoprotein 1 as a clinicopathological biomarker of glioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **79**(8), 873–879. DOI: 10.1093/jnen/nlaa058
  46. *Furuta T., Miyoshi H., Moritsubo M., Nakajima R., Negoto T., Nakamura H., Morioka M., Uchida Y., Ohtsuki S., Nakada M.* (2025) Biological role and clinicopathological significance of leucine-rich  $\alpha$ -2 glycoprotein 1 in the glioblastoma microenvironment. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **84**(8), 707–714. DOI: 10.1093/jnen/nlaf049
  47. *Kumar D.M., Thota B., Shinde S.V., Prasanna K.V., Hegde A.S., Arivazhagan A., Chandramouli B.A., Santosh V., Somasundaram K.* (2010) Proteomic identification of haptoglobin  $\alpha$ 2 as a glioblastoma serum biomarker: implications in cancer cell migration and tumor growth. *J. Proteome Res.*, **9**(11), 5557–5567. DOI: 10.1021/pr1001737
  48. *Ронжина Н.Л., Зорина Е.С., Завьялова М.Г., Легина О.К., Нарыжный С.Н.* (2024) Вариабельность протеоформа бета-цепи гаптоглобина. *Биомедицинская химия*, **70**(2), 114–124. [Ronzhina N.L., Zorina E.S., Zavalova M.G., Legina O.K., Naryzhny S.N. (2024) Variability of haptoglobin beta-chain proteoforms. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **70**(2), 114–124.] DOI: 10.18097/PBMC20247002114
  49. *Naryzhny S., Ronzhina N., Zorina E., Kabachenko F., Zavalova M., Zgoda V., Klopov N., Legina O., Pantina R.* (2021) Evaluation of haptoglobin and its proteoforms as glioblastoma markers. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(12), 6533. DOI: 10.3390/ijms22126533
  50. *Odiase P., Ma J., Ranganathan S., Ogunkua O., Turner W.B., Marshall D., Ochieng J.* (2024) The role of fetuin-A in tumor cell growth, prognosis, and dissemination. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**(23), 12918. DOI: 10.3390/ijms252312918
  51. *Petrik V., Saadoun S., Loosemore A., Hobbs J., Opstad K.S., Sheldon J., Tarelli E., Howe F.A., Bell B.A., Papadopoulos M.C.* (2008) Serum  $\alpha$ 2-HS glycoprotein predicts survival in patients with glioblastoma. *Clin. Chem.*, **54**(4), 713–722. DOI: 10.1373/clinchem.2007.096792
  52. *Petushkova N.A., Zgoda V.G., Pyatnitskiy M.A., Larina O.V., Teryaeva N.B., Potapov A.A., Lisitsa A.V.* (2017) Post-translational modifications of FDA-approved plasma biomarkers in glioblastoma samples. *PLOS One*, **12**(5), e0177427. DOI: 10.1371/journal.pone.0177427
  53. *van Linde M.E., van der Mijn J.C., Pham T.V., Knol J.C., Wedekind L.E., Hovinga K.E., Aliaga E.S., Buter J., Jimenez C.R., Reijneveld J.C., Verheul H.M.W.* (2016) Evaluation of potential circulating biomarkers for prediction of response to chemoradiation in patients with glioblastoma. *J. Neurooncol.*, **129**(2), 221–230. DOI: 10.1007/s11060-016-2178-x
  54. *Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I.* (2016) The size of the human proteome: the width and depth. *Int. J. Anal. Chem.*, **2016**, 7436849. DOI: 10.1155/2016/7436849
  55. *Gautam P., Nair S.C., Gupta M.K., Sharma R., Polisetty R.V., Chandak G.R., Harsha H.C., Sirdeshmukh R.* (2012) Proteins with altered levels in plasma from glioblastoma

- patients as revealed by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. *PLOS One*, **7**(9), e46153. DOI: 10.1371/journal.pone.0046153
56. Ji Q., Li Z., Guo Y., Zhang X. (2024) S100A9, as a potential predictor of prognosis and immunotherapy response for GBM, promotes the malignant progression of GBM cells and migration of M2 macrophages. *Aging (Albany N.Y.)*, **16**(15), 11513–11534. DOI: 10.18632/aging.205949
  57. Kalluri R. (2016) The biology and function of exosomes in cancer. *J. Clin. Invest.*, **126**(4), 1208–1215. DOI: 10.1172/JCI81135
  58. El Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J.A. (2013) Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **12**(5), 347–357. DOI: 10.1038/nrd3978
  59. Kalluri R. (2024) The biology and function of extracellular vesicles in immune response and immunity. *Immunity*, **57**(8), 1752–1768. DOI: 10.1016/j.immuni.2024.07.009
  60. Chiaradia E., Tancini B., Emiliani C., Delo F., Pellegrino R.M., Tognoloni A., Urbanelli L., Buratta S. (2021) Extracellular vesicles under oxidative stress conditions: biological properties and physiological roles. *Cells*, **10**(7), 1763. DOI: 10.3390/cells10071763
  61. Keshkar S., Azarpira N., Ghahremani M.H. (2018) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 63. DOI: 10.1186/s13287-018-0791-7
  62. Maacha S., Bhat A.A., Jimenez L., Raza A., Haris M., Uddin S., Grivel J.-C. (2019) Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Mol. Cancer*, **18**, 55. DOI: 10.1186/s12943-019-0965-7
  63. Ortiz A. (2021) Extracellular vesicles in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.*, **76**(3), 139–142. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.05.032
  64. Marar C., Starich B., Wirtz D. (2021) Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nat. Immunol.*, **22**(5), 560–570. DOI: 10.1038/s41590-021-00899-0
  65. Zhang C., Qin C., Dewanjee S., Bhattacharya H., Chakraborty P., Jha N.K., Gangopadhyay M., Jha S.K., Liu Q. (2024) Tumor-derived small extracellular vesicles in cancer invasion and metastasis: molecular mechanisms, and clinical significance. *Mol. Cancer*, **23**, 18. DOI: 10.1186/s12943-024-01932-0
  66. Ramos-Zaldívar H.M., Polakovicova I., Salas-Huenuleo E., Corvalán A.H., Kogan M.J., Yefi C.P., Andia M.E. (2022) Extracellular vesicles through the blood-brain barrier: a review. *Fluids Barriers CNS*, **19**, 60. DOI: 10.1186/s12987-022-00359-3
  67. Saint-Pol J., Gosselet F., Duban-Deweer S., Pottiez G., Karamanos Y. (2020) Targeting and crossing the blood-brain barrier with extracellular vesicles. *Cells*, **9**(4), 851. DOI: 10.3390/cells9040851
  68. Kalluri R., McAndrews K.M. (2023) The role of extracellular vesicles in cancer. *Cell*, **186**(8), 1610–1626. DOI: 10.1016/j.cell.2023.03.010
  69. Li J., He X., Deng Y., Yang C. (2019) An update on isolation methods for proteomic studies of extracellular vesicles in biofluids. *Molecules*, **24**(19), 3516. DOI: 10.3390/molecules24193516
  70. Sidhom K., Obi P.O., Saleem A. (2020) A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(18), 6466. DOI: 10.3390/ijms21186466
  71. Veerman R.E., Teeuwen L., Czarnewski P., Güçlüler Akpınar G., Sandberg A.S., Cao X., Pernemalm M., Orre L.M., Gabrielsson S., Eldh M. (2021) Molecular evaluation of five different isolation methods for extracellular vesicles reveals different clinical applicability and subcellular origin. *J. Extracell. Vesicles*, **10**(9), e12128. DOI: 10.1002/jev2.12128
  72. Xiao J. (2023) Updated methods of extracellular vesicles isolation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1418**, 3–14. DOI: 10.1007/978-981-99-1443-2\_1
  73. Suresh P.S., Zhang Q. (2025) Comprehensive comparison of methods for isolation of extracellular vesicles from human plasma. *J. Proteome Res.*, **24**(6), 2956–2967. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5c00149
  74. Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., Buzas E.I., Blenkinsop C., Bussolati B., Cai H., di Vizio D., Friedonks T.A.P., Erdbrügger U., Falcon-Perez J.M., Fu Q.L., Hill A.F., Lenassi M., Lim S.K., Mahoney M.G., Mohanty S., Möller A., Nieuwland R., Ochiya T., Sahoo S., Torrecilhas A.C., Zheng L., Zijlstra A., Abuelreich S., Bagabas R., Bergese P., Bridges E.M., Brucale M., Burger D., Carney R.P., Cocucci E., Crescitelli R., Hanser E., Harris A.L., Haughey N.J., Hendrix A., Ivanov A.R., Jovanovic-Talisman T., Kruh-Garcia N.A., Ku'ulei-Lyn Faustino V., Kyburz D., Lässer C., Lennon K.M., Lötvall J., Maddox A.L., Martens-Uzunova E.S., Mizenko R.R., Newman L.A., Ridolfi A., Rohde E., Rojalin T., Rowland A., Saftics A., Sandau U.S., Saugstad J.A., Shekari F., Swift S., Ter-Ovanesyan D., Tosar J.P., Useckaite Z., Valle F., Varga Z., van der Pol E., van Herwijnen M.J.C., Wauben M.H.M., Wehman A.M., Williams S., Zandrini A., Zimmerman A.J.; MISEV Consortium; Théry C., Witwer K.W. (2024) Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *J. Extracell. Vesicles*, **13**(2), e12404. DOI: 10.1002/jev2.12404
  75. Lane R., Simon T., Vintu M., Solkin B., Koch B., Stewart N., Benstead-Hume G., Pearl F.M.G., Critchley G., Stebbing J., Giamas G. (2019) Cell-derived extracellular vesicles can be used as a biomarker reservoir for glioblastoma tumor subtyping. *Commun. Biol.*, **2**, 315. DOI: 10.1038/s42003-019-0560-x
  76. Binda E., Visioli A., Giani F., Trivieri N., Palumbo O., Restelli S., Dezi F., Mazza T., Fusilli C., Legnani F., Carella M., di Meco F., Duggal R., Vecovi A.L. (2017) Wnt5a drives an invasive phenotype in human glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res.*, **77**(4), 996–1007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1693
  77. Guo S.-K., Shen M.-F., Yao H.-W., Liu Y.-S. (2018) Enhanced expression of TGFBI promotes the proliferation and migration of glioma cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, **49**(3), 1097–1109. DOI: 10.1159/000493293
  78. Peng P., Zhu H., Liu D., Chen Z., Zhang X., Guo Z., Dong M., Wan L., Zhang P., Liu G., Zhang S., Dong F., Hu F., Cheng F., Huang S., Guo D., Zhang B., Yu X., Wan F. (2022) TGFBI secreted by tumor-associated macrophages promotes glioblastoma stem cell-driven tumor growth via integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5-*Src*-*Stat3* signaling. *Theranostics*, **12**(9), 4221–4236. DOI: 10.7150/THNO.69605
  79. Zhang Y., Xiao X., Yang G., Jiang X., Jiao S., Nie Y., Zhang T. (2025) STAT3/TGFBI signaling promotes the temozolomide resistance of glioblastoma through upregulating glycolysis by inducing cellular senescence. *Cancer Cell Int.*, **25**, 127. DOI: 10.1186/s12935-025-03770-6

80. Chédeville A.L., Lourdasamy A., Monteiro A.R., Hill R., Madureira P.A. (2020) Investigating glioblastoma response to hypoxia. *Biomedicines*, **8**(9), 310. DOI: 10.3390/biomedicines8090310
81. Codó P., Weller M., Kaulich K., Schraivogel D., Silginer M., Reifenberger G., Meister G., Roth P. (2016) Control of glioma cell migration and invasiveness by GDF-15. *Oncotarget*, **7**(7), 7732–7746. DOI: 10.18632/oncotarget.6816
82. Bentaberry-Rosa A., Nicaise Y., Delmas C., Gouazé-Andersson V., Cohen-Jonathan-Moyal E., Seva C. (2024) Overexpression of growth differentiation factor 15 in glioblastoma stem cells promotes their radioresistance. *Cancers (Basel)*, **16**(1), 27. DOI: 10.3390/cancers16010027
83. Naryzhny S., Volnitskiy A., Kopylov A., Zorina E., Kamyshtinsky R., Bairamukov V., Garaeva L., Shlikht A., Shtam T. (2020) Proteome of glioblastoma-derived exosomes as a source of biomarkers. *Biomedicines*, **8**(7), 216. DOI: 10.3390/biomedicines8070216
84. Нарыжный С.Н., Ронжина Н.Л., Майнскова М.А., Белякова Н.В., Пантина Р.А., Филатов М.В. (2014) Разработка штрих-кода и получение белкового профиля глиобластомы. *Биомедицинская химия*, **60**(3), 308–321. [Naryzhny S.N., Ronzhina N.L., Mainskova M.A., Belyakova N.V., Pantina R.A., Filatov M.V. (2014) Development of barcode and proteome profiling of glioblastoma. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **60**(3), 308–321.] DOI: 10.18097/PBMC20146003308
85. Anastasi F., Greco F., Dilillo M., Vannini E., Cappello V., Baroncelli L., Costa M., Gemmi M., Caleo M., McDonnell L.A. (2020) Proteomics analysis of serum small extracellular vesicles for the longitudinal study of a glioblastoma multiforme mouse model. *Sci. Rep.*, **10**, 20498. DOI: 10.1038/s41598-020-77535-8
86. Greco F., Anastasi F., Pardini L.F., Dilillo M., Vannini E., Baroncelli L., Caleo M., McDonnell L.A. (2021) Longitudinal bottom-up proteomics of serum, serum extracellular vesicles, and cerebrospinal fluid reveals candidate biomarkers for early detection of glioblastoma in a murine model. *Molecules*, **26**(19), 5992. DOI: 10.3390/molecules26195992
87. Indira Chandran V., Welinder C., Mansson A.S., Offer S., Freyhult E., Pernemalm M., Lund S.M., Pedersen S., Lehtio J., Marko-Varga G., Johansson M.C., Englund E., Sundgren P.C., Belting M. (2019) Ultrasensitive immunoprofiling of plasma extracellular vesicles identifies syndecan-1 as a potential tool for minimally invasive diagnosis of glioma. *Clin. Cancer Res.*, **25**(10), 3115–3127. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2946
88. Luce A., Abate M., Scognamiglio G., Montella M., Iervolino D., Campione S., di Mauro A., Sepe O., Gigantino V., Tathode M.S., Ferrara G., Monaco R., de Dominicis G., Misso G., Gentile V., Franco R., Zappavigna S., Caraglia M. (2024) Immune cell infiltration and inflammatory landscape in primary brain tumours. *J. Transl. Med.*, **22**, 521. DOI: 10.1186/s12967-024-05309-1
89. Zheng W., Chen Q., Liu H., Zeng L., Zhou Y., Liu X., Bai Y., Zhang J., Pan Y., Shao C. (2023) SDC1-dependent TGM2 determines radiosensitivity in glioblastoma by coordinating EPG5-mediated fusion of autophagosomes with lysosomes. *Autophagy*, **19**(3), 839–857. DOI: 10.1080/15548627.2022.2105562
90. Zeng L., Zheng W., Liu X., Zhou Y., Jin X., Xiao Y., Bai Y., Pan Y., Zhang J., Shao C. (2023) SDC1-TGM2-FLOT1-BHMT complex determines radio sensitivity of glioblastoma by influencing the fusion of autophagosomes with lysosomes. *Theranostics*, **13**(11), 3725–3743. DOI: 10.7150/thno.81999
91. Osti D., del Bene M., Rappa G., Santos M., Matafora V., Richichi C., Faletti S., Beznoussenko G.V., Mironov A., Bachi A., Fornasari L., Bongetta D., Gaetani P., DiMeco F., Lorico A., Pelicci G. (2019) Clinical significance of extracellular vesicles in plasma from glioblastoma patients. *Clin. Cancer Res.*, **25**(1), 266–276. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1941
92. Zhu H., Yu X., Zhang S., Shu K. (2021) Targeting the complement pathway in malignant glioma microenvironments. *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 657472. DOI: 10.3389/FCELL.2021.657472
93. Hallal S., Azimi A., Wei H., Ho N., Lee M.Y.T., Sim H.-W., Sy J., Shivalingam B., Buckland M.E., Alexander-Kaufman K.L. (2020) A comprehensive proteomic SWATH-MS workflow for profiling blood extracellular vesicles: a new avenue for glioma tumour surveillance. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(13), 4754. DOI: 10.3390/ijms21134754
94. Mallawaarachy D.M., Hallal S., Russell B., Ly L., Ebrahimkhani S., Wei H., Christopherson R.I., Buckland M.E., Kaufman K.L. (2017) Comprehensive proteome profiling of glioblastoma-derived extracellular vesicles identifies markers for more aggressive disease. *J. Neurooncol.*, **131**(2), 233–244. DOI: 10.1007/s11060-016-2298-3
95. Liu G., Zhang P., Chen S., Chen Z., Qiu Y., Peng P., Huang W., Cheng F., Zhang Y., Li H., Xiao Q., Mao F., Wang B., Jiang X., Wan F., Guo D., Yu X. (2023) FAM129A promotes self-renewal and maintains invasive status via stabilizing the Notch intracellular domain in glioma stem cells. *Neuro. Oncol.*, **25**(10), 1788–1801. DOI: 10.1093/neuonc/noad079
96. Шушкова Н.А., Вавилов Н.Э., Новикова С.Е., Фарафонова Т.Е., Тихонова О.В., Ляо Пао-чи, Згода В.Г. (2018) Количественный протеомный анализ экзосом крови человека. *Биомедицинская химия*, **64**(6), 496–504. [Shushkova N.A., Vavilov N.E., Novikova S.E., Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Liao P.-C., Zgoda V.G. (2018) Quantitative proteomics of human blood exosomes. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **64**(6), 496–504.] DOI: 10.18097/PBMC20186406496
97. Henry N.L., Hayes D.F. (2012) Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.*, **6**(2), 140–146. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.01.010
98. Novikova S.E., Soloveva N.A., Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Liao P.-C., Zgoda V.G. (2021) Proteomic signature of extracellular vesicles for lung cancer recognition. *Molecules*, **26**(20), 6145. DOI: 10.3390/molecules26206145
99. Soloveva N., Novikova S., Farafonova T., Tikhonova O., Zgoda V. (2023) Proteomic signature of extracellular vesicles associated with colorectal cancer. *Molecules*, **28**(10), 4227. DOI: 10.3390/molecules28104227
100. Soloveva N., Novikova S., Farafonova T., Tikhonova O., Zgoda V. (2025) Secretome and proteome of extracellular vesicles provide protein markers of lung and colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **26**(3), 1016. DOI: 10.3390/ijms26031016

Поступила в редакцию: 12.11.2025.  
 После доработки: 04.12.2025.  
 Принята к печати: 05.12.2025.

**CIRCULATING PROTEIN BIOMARKERS OF GLIOBLASTOMA:  
METHODOLOGIC APPROACHES AND PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT**

*V.A. Maïorov\*, O.V. Tikhonova, V.G. Zgoda*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: vamaïorov23@gmail.com

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive primary brain tumor, characterized by an extremely poor prognosis. Difficulties in diagnostics and monitoring this disease stimulate the search for minimally invasive approaches. In this context liquid biopsy is considered as a promising approach. This review analyzes results of recent studies aimed at identifying circulating protein biomarkers of GBM in plasma and serum. These biomarkers include cell-free circulating plasma proteins and proteins of extracellular vesicles (EVs). Special attention is paid to the results obtained using both immunochemical methods and mass spectrometric approaches for identification of protein biomarkers, which have been summarized here as a list of identified potential diagnostic and prognostic biomarkers. Analysis of the literature demonstrates that proteomic analysis focused on the plasma EV fraction significantly expands the possibilities for identifying biomarkers for noninvasive GBM diagnostics and monitoring.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Keywords:** glioblastoma; circulating biomarkers; extracellular vesicles; proteomics

**Funding.** The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (no. 122030100168-2).

Received: 12.11.2025; revised: 04.12.2025; accepted: 05.12.2025.