

**Abstract**

**M. G. Mazur,**

**T. V. Pyatchanina,**

*R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAMS of Ukraine, 45 Vasylkivska str, Kyiv, Ukraine, 03022*

**MAIN DIRECTIONS OF PROTEOMIC RESEARCHES IN BREAST CANCER**

The review focuses on the application of proteomics analysis areas to implement the results obtained in clinical practice for prevention, screening, diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer. The results of the few studies on the role of extracellular matrix in breast tumor genesis considered to improve prevention. In the development of new screening programs are important results of the study of the relationship of features of tumor progression and specific protein markers of tumor tissue and urine. Improved diagnosis is impossible due to the identification of signatures of protein markers molecular subtypes of tumors, as well as the implementation of the results of the study of post-translational modifications of proteins associated with tumor progression. Proteomic profiling to identify target proteins chemotherapy action also represents new opportunities for the development of innovative medicines and to control the invasive properties of cancer by affecting the proteins of the tumor microenvironment. Proteomic profiling to improve the prognosis of the disease involves the identification and validation of a number of protein biomarkers: associated with the degree of histological grading (G1, G2, G3) tumors; proteomic markers predicting of metastasis, markers predicting response to neoadjuvant systemic therapy, as well as related to progression-free survival of patients after adjuvant chemotherapy. The results are of practical importance in the stratification of patients for the purpose of neoadjuvant and adjuvant systemic chemotherapy. In addition, the method is considered innovative use of LC-MS/MS for the identification of protein markers. Separately elucidated the question of the progressive development of methods of verification and validation of the results of research in modern experiments using proteomic analysis.

**Keywords:** breast cancer, trends of proteomic analysis, mass spectrometry-based combined method LC–MS/MS.

**Corresponding author:** *maria.mazur.17@gmail.com*

**Резюме**

**М. Г. Мазур,**

**Т. В. П'ятчаніна,**

*Інститут експериментальної патології, онкології, і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, вул. Васильківська 45, Київ, Україна, 03022*

**ОСНОВНІ НАПРЯМКИ ДОСЛІДЖЕНЬ ПРОТЕОМУ ПРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

В огляді особлива увага приділяється напрямам застосування протеомного аналізу з метою впровадження отриманих результатів в клінічну практику для профілактики, скринінгу, діагностики, терапії і прогнозу раку молочної залози. Для поліпшення профілактики розглядаються результати нечисленних досліджень ролі екстрацелюлярного матриксу в онкогенезі молочних залоз. У розробці нових скринінгових програм важливе значення мають результати вивчення взаємозв'язку особливостей прогресії пухлини і специфічних білкових маркерів пухлинної тканини і сечі. Поліпшення діагностики можливе завдяки ідентифікації сигнатур білкових маркерів

молекулярних підтипів пухлин, а також впровадження результатів дослідження пост-трансляційних модифікацій білків, пов'язаних з прогресією пухлини. Протеомне профілювання з метою ідентифікації білків-мішеней дії хіміотерапії також відкриває нові можливості для розробки інноваційних лікарських засобів і для контролю над інвазивними властивостями пухлини за допомогою впливу на білки мікрооточення пухлини. Протеомне профілювання з метою поліпшення прогнозу захворювання включає ідентифікацію та валідацію ряду білкових біомаркерів: асоційованих зі ступенем патогістологічної градації (G1, G2, G3) пухлин; прогностичних протеомних маркерів метастазування, маркерів прогнозування відповіді на неoad'ювантну системну терапію, а також пов'язаних з безрецидивною тривалістю життя хворих після ад'ювантної хіміотерапії. Отримані результати мають практичне значення при стратифікації пацієнтів для призначення неoad'ювантної і ад'ювантної системної хіміотерапії. Крім того, розглядається інноваційне використання методу LC-MS/MS для ідентифікації білкових маркерів. Окремо висвітлено питання прогресивного розвитку методів верифікації та валідації результатів досліджень в сучасних експериментах з використанням протеомного аналізу.

**Ключові слова:** рак молочної залози, напрямки аналізу протеому, комбінований метод на основі мас-спектрометрії LC-MS/MS.

#### Резюме

М. Г. Мазур,

Т. В. Пятчанина,

*Институт експериментальної патології, онкології, і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України, ул. Васильківська 45, Київ, Україна, 03022*

#### ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОТЕОМА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В обзоре особое внимание уделяется направлениям применения протеомного анализа с целью внедрения полученных результатов в клиническую практику для профилактики, скрининга, диагностики, терапии и прогноза рака молочной железы. Для улучшения профилактики рассматриваются результаты немногочисленных исследований роли экстрацеллюлярного матрикса в онкогенезе молочных желез. В разработке новых скрининговых программ важное значение имеют результаты изучения взаимосвязи особенностей прогрессии опухоли и специфических белковых маркеров опухолевой ткани и мочи. Улучшение диагностики представляется возможным вследствие идентификации сигнатур белковых маркеров молекулярных подтипов опухолей, а также внедрения результатов исследования пост-трансляционных модификаций белков, связанных с прогрессией опухоли. Протеомное профилирование с целью идентификации белков-мишеней действия химиотерапии представляет также новые возможности для разработки инновационных лекарственных средств и для контроля над инвазивными свойствами опухоли посредством влияния на белки микроокружения опухоли. Протеомное профилирование с целью улучшения прогноза заболевания включает идентификацию и валідацію ряду білкових біомаркерів: асоційованих со ступенню патогістологічної градації (G1, G2, G3) опухолей; прогностических протеомних маркерів метастазування, маркерів прогнозування відповіді на неoad'ювантну системну терапію, а також пов'язаних з безрецидивною тривалістю життя хворих після ад'ювантної хіміотерапії. Отримані результати мають практичне значення при стратифікації пацієнтів для призначення неoad'ювантної



и адьювантной системной химиотерапии. Кроме того, рассматривается инновационное использование метода LC-MS/MS для идентификации белковых маркеров. Отдельно освещен вопрос прогрессивного развития методов верификации и валидации результатов исследований в современных экспериментах с использованием протеомного анализа.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, направления анализа протеома, комбинированный метод на основе масс-спектрометрии LC-MS/MS.

**Автор, відповідальний за листування:** [maria.mazur.17@gmail.com](mailto:maria.mazur.17@gmail.com)

## Вступ

Согласно эпидемиологическим данным, рак молочной железы (РМЖ) – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний женщин во всем мире [1]. По данным Национального-канцер-реестра Украины, заболеваемость РМЖ женщин Украины (2014 г.) достигает показателя 70 человек на 100 тыс. населения, а смертность в результате этого заболевания – 30,2 на 100 тыс. [2]. Аналогичные мировые показатели – 41,7 человека на 100 тыс. и 15,7 на 100 тыс., соответственно [2]. Использование традиционных инструментальных средств диагностики с учетом недостатков методов ультразвукового исследования, маммографии и томографии не обеспечивает в полной мере ранней точной и дифференциальной диагностики РМЖ. Использование широко известных диагностических маркеров (CA-15-3, CA 27-29, ER, PR, HER-2, Ki-67) с целью диагностики, прогноза и мониторинга течения заболевания не всегда обеспечивает корректные результаты [3]. Протеомный анализ, позволяющий идентифицировать несколько тысяч белков в одном образце, является новым и актуальным инструментом в получении результатов, которые могут повлиять на прогресс профилактики, скрининга, ранней диагностики, терапии, мониторинга и прогноза РМЖ.

Целью данного обзора является анализ современных направлений и инновационных подходов к исследованию протеома РМЖ, а также практического потенциала валидации полученных результатов.

### Протеомный анализ рака молочной железы

Онкопротеомика изучает состав (профиль) и структурно-функциональные свойства белков в опухолях и биологических жидкостях пациентов. Результаты исследований структурной онкопротеомики применяются в клинической диагностике, а функциональной – при разработке

принципиально новых терапевтических препаратов (ингибиторов/активаторов индивидуальных белковых мишеней).

Основными задачами протеомики РМЖ являются: идентификация диагностических, прогностических, предиктивных протеомных биомаркеров; анализ динамики их образования в ходе заболевания; идентификация путей и каскадов передачи клеточных сигналов при злокачественной трансформации, возникновении инвазивных свойств и прогрессии опухоли; идентификация и анализ динамики изменения посттрансляционных модификаций белков в биологическом материале пациентов.

Белковые маркеры опухолей молочной железы (МЖ) – это молекулы белков, присутствующие в определенных концентрациях в опухоли или/и биологических жидкостях, которые коррелируют с наличием, объемом, прогрессией опухоли, имеют высокую чувствительность и специфичность, а также информируют о гистологическом типе опухоли.

Выявленная совокупность белков составляет «протеом» (англ. *proteome*) жидкости или ткани, из которых была выделена белковая фракция. Информация обо всех белках, которые были идентифицированы в исследовании в крови, других биологических жидкостях или тканях составляет понятие «протеомный профиль» (англ. *proteomic profile*). Протеомный профиль может быть использован для диагностики, прогноза и мониторинга течения заболевания для определения реакции организма на лечение.

Современный поиск протеомных биомаркеров при РМЖ проводится путем профилирования биологического материала пациентов методами протеомики, в основном, с использованием квантификационной технологии протеомного профилирования LC-MS/MS и стратегий «снизу-вверх» (bottom-up) и «сверху-вниз» (top-down). Спектр объектов исследований доста-



точно широк. Протеомное профилирование на выявление маркеров проводят при: прогрессии РМЖ (различный статус лимфоузлов [4-6], метастазирование [7-9]); определении молекулярных подтипов РМЖ (с различным статусом рецепторов к эстрогену и прогестерону [4, 10, 11], с оверэкспрессией рецептора к эпидермальному фактору роста человека [4, 10-14], трижды негативный [4, 5, 10, 11, 13, 15], базальный и люминальный [14, 16, 17]); исследовании опухолей МЖ с различной степенью патогистологической градации [18, 19].

Анализ протеома РМЖ также проводится с целью идентификации маркеров, которые могут быть информативными при профилактике, скрининге, диагностике, терапии, мониторинге и прогнозе течения заболевания.

**Профилактика.** С использованием протеомного анализа дополнены данные о роли экстрацеллюлярного матрикса (англ. *extracellular matrix*, ECM) в супрессивном влиянии на опухоль МЖ, а именно доказано влияние коллагена экстрацеллюлярного матрикса ткани МЖ, окружающей опухолевую ткань, которое заключается в угнетении клеточных программ, реализующих инвазивные свойства опухолевых клеток [20].

Явление снижение риска развития РМЖ, связанное с рождением ребенка в раннем возрасте, известно, как «защитный эффект беременности» [20]. Изменения, которые происходят в период беременности и лактации в ткани МЖ касаются и белкового состава ECM [21]. Выполняя функции потенциального защитного медиатора, индуцированного беременностью, ECM принимает участие в онкогенезе, имеет плейотропное влияние на адгезию, пролиферацию, выживаемость, инвазию, дифференцировку клеток [22, 23]. Плотность структуры фибриллярного коллагена (collagen), являющегося компонентом ECM МЖ, коррелирует с повышенной маммографической плотностью МЖ [24], повышая количество ложнопозитивных результатов рентгенологических исследований. Организация и степень жесткости фибриллярного коллагена являются ключевыми медиаторами роста и инвазии опухолевых клеток МЖ [25, 26, 27]. Радиальная ориентация коллагеновых волокон в пределах опухоли сопровождается неблагоприятным прогнозом [28]. Все эти факты стали основой новых подходов к исследованию роли белков ECM МЖ в процессах инвазии, результаты которых, по мнению авторов [20],

помогут выявить новые механизмы латентности РМЖ и способы профилактики. Исследованы (bottom-up, 2D-LC-MS/MS) функция, состав и пространственная структура ECM МЖ рожавших и не рожавших крыс, нормальных тканей (гистологический контроль) МЖ женщин пременопаузального возраста с первичным РМЖ, а также клеточных линий РМЖ [20]. Установлена связь между повышенным количеством коллагена-I и фактом рождения (результаты в группе рожавших крыс тождественно соотносятся с наблюдениями у рожавших женщин). Такой коллаген отличается менее линейной структурой, ассоциированной с уменьшенной жесткостью стромы, что имеет значение для «защитного эффекта беременности» (англ. *parity-induced protection*). С использованием 3D-моделей клеточных культур показано, что линейный (фибриллярный) коллаген-I индуцирует клеточный фенотип, соответствующий инвазивному и влияет на внутриклеточное распределение b1-интегрина. В то же время, не фибриллярный коллаген-I высокой плотности индуцирует опухоль-супрессивные свойства: повышает уровень соединительного E-кадгерина в опухолях, также снижает регуляцию генов, кодирующих металлопротеиназу, что является свойством мезенхимального фенотипа. Эти данные свидетельствуют о роли не только плотности коллагена, но и его организации в качестве ключевых факторов инвазивного фенотипа. Дальнейшие исследования в направлении выяснения взаимосвязи репродуктивной истории, ремоделирования коллагена МЖ и злокачественности опухолевых клеток, по мнению авторов [20], сделают важный вклад в разработку возможных способов снижения риска РМЖ у женщин.

**Скрининг.** С целью разработки релевантных тест-систем для скрининга проведено [7] (bottom-up, LC-MS/MS) протеомное профилирование различных форм РМЖ и установлено взаимосвязь между прогрессией РМЖ и набором специфических белковых маркеров исследованных новообразований. У больных с преинвазивной протоковой карциномой идентифицированы белки лейцин LRC36, MAST4, не охарактеризованный белок CI131, с ранним инвазивным РМЖ – белки DYN8, HBA, PEPA, MMRN2, филаггрин, не охарактеризованный белок C4orf14 (CD014), с метастатическим РМЖ – белки AGRIN, NEGR1, FIBA, кератин KIC10. Из перечисленных белков в ткани опухолей валидирован лишь один - MAST4. Эти результаты, по



мнению авторов, послужат основой создания адекватных скрининговых тестов.

**Диагностика.** С целью выявления особенностей протеома молекулярных подтипов трижды негативного (ER-/PR-/Her2-) [12] и HER2+ [15] РМЖ проведен протеомный анализ (стратегия bottom-up, LC-MS/MS, iTRAQ-MD-LC-MS/MS). В ткани трижды негативного (ER-/PR-/Her2-) РМЖ [12] впервые идентифицированы 12000 различных белков вовлеченных в механизмы передачи сигналов в опухолевой клетке. В опухолевой ткани инвазивного протокового РМЖ люминального В HER2+ve подтипа и HER2+ подтипа РМЖ (англ. *HER2+ enriched*) выявлено 67 опухолевых маркеров, из них для люминального В HER2+ve валидированы онкомаркеры APOA1, GELS, hs90b, EF1A1, PRDX3, NHRF1, а в ткани HER2+ подтипа – PRDX1, catD, CALR, atpB, CH60 [15]. Указанные маркеры могут быть эффективно использованы с целью ранней диагностики РМЖ в группах риска.

В образцах сыворотки крови, мочи и первичных опухолей (парафиновые блоки) больных РМЖ исследовали экспрессию (лектиновые микрочипы; стратегия bottom-up и LC-MS/MS) [8, 29] белковых изоформ и белков, состав и функции которых изменены вследствие посттрансляционных модификаций. Анализ гликозилированных белков сыворотки крови и мочи пациентов с метастатическим РМЖ выявил маркеры метастазирования с диагностическим и предиктивным потенциалом - кадгерин 5 и лектин-связанные паттерны белков, включая N-и O-гликаны [8, 29]. Из всех исследованных белков в сыворотке крови больных с рецидивами и без рецидивов (по прошествии 5 лет после терапии по поводу РМЖ) валидирован [29] диагностический маркер метастазирования РМЖ – кадгерин-5.

**Терапия.** Протеомное профилирование выполняется также с целью поиска и идентификации мишеней действия терапевтических препаратов [10, 13]. Так, с использованием заключенного в парафиновые блоки (formalin-fixed, paraffin-embedded - FFPE) материала опухолей РМЖ с различным статусом молекулярных маркеров (ER+/PR+, Her2+, ER-/PR-/Her2-) и клеточных линий РМЖ (HCC1599, MCF7, HCC1937) установлено (стратегия bottom-up, SILAC-LC-MS/MS, LC-MS/MS) функциональные связи между мультифункциональными белками и клеточными процессами на уровне гено-

ма и транскриптома [10]. Функциональные различия сетевых белков (англ. *the network proteins*) между подтипами РМЖ касаются трансляции мРНК, особенностей роста клеток и межклеточных взаимодействий, энергетического метаболизма (глубина анализа - 410000 белков) [10]. В целом, выявляя молекулярные сети белковых взаимодействий, эти результаты [10] отражают основные функциональные различия между подтипами РМЖ, что позволяет говорить о практическом назначении идентифицированных уникальных «персональных» протеомных профилей каждого из подтипов, а именно, о персонализированном подходе к терапии с их применением. Отличия в экспрессии белковых участников трансляционных сетей, сетей аминокислотного и энергетического обмена (обмен жирных кислот и аминокислот, окисление спирта, глюконеогенез), репликации и роста, опухолевых супрессоров (например, из онкогенного пути *PI3K*), сетей биосинтеза и метаболизма гликана (гликозилирование), сети белок-белковых взаимодействий (электрон-транспортной цепи, окислительного фосфорилирования, гликолиза, синтеза серина, потребления глутамин) в опухолях рассмотренных подтипов, по мнению авторов [10], указывает на использование разных метаболитов и компонентов синтеза для поддержания роста и выживания опухолей, что может успешно использоваться в процессе разработки лекарственных препаратов.

В тоже время, с использованием материала тканей опухолей HER2+ и ER-/PR-/Her2-, выявлены (стратегия bottom-up, LC-MS/MS) белковые маркеры ответа на неоадьювантную химиотерапию (Taxotere/Carboplatin ± Herceptin): для HER2+ – это белок SK19, а для ER-/PR-/Her2- – это биомаркер опухолевой прогрессии и метастазирования белок G3BP [13].

Проведен поиск белков-мишеней применяемой адьювантной химиотерапии [5] и мишеней для разработки новых препаратов – ингибиторов этих белков [30]. Так, на опухолевом материале пациентов с трижды негативным (ER-/PR-/Her2-) РМЖ и негативным статусом лимфоузлов, которые не получали адьювантной химиотерапии, выявлено (стратегия bottom-up, nLC-MS/MS) и валидировано [5] 11 белковых сигнатур (белковые продукты генов *CAPZB, AIFM1, STX12, CMPK1, EML4, FTH1, AP1G1, MTHFD1, GANAB, CTNNA1, AP1M1*), которые



могут быть использованы для установления целесообразности назначения адьювантной химиотерапии пациентам с подобным опухолевым процессом. С использованием стратегии bottom-up, LC-MS/MS с изотопным разведением в опухолевом материале также исследован и валидирован [30] прогностический маркер – фермент APE1, функционально это основной белок эксцизионной репарации ДНК. Он предложен исследователями в качестве мишени для разработки новых препаратов – ингибиторов этого белка, поскольку его гипер-/гипоэкспрессия связана со снижением/увеличением процента выживаемости опухолевых клеток [30].

С целью создания пула белковых сигнатур для разработки новых терапевтических препаратов, которые осуществляли бы контроль над инвазивными свойствами опухоли через воздействие на ее микроокружение [31], проведено исследование (стратегия bottom-up, LC-MS/MS) биоптата аденокарциномы МЖ, а именно опухоль-ассоциированных фибробластов и материала культуры клеток ZR-75-1. Сравнительный анализ белков фибробластов биоптата и клеточной системы показал возможность использования биоптата для оценки клеток, находящихся в состоянии покоя, воспаления и раневого заживления. Протеомный профиль опухоль-ассоциированных фибробластов оказался близок к протеомному профилю фибробластов в состоянии раневого заживления. Идентифицированные протеомные профили опухоль-ассоциированных фибробластов имеют значительный прогностический и предиктивный потенциал.

**Прогноз.** С целью улучшения классификации TNM и прогноза течения заболевания проведено идентификацию (афинная хроматография; стратегия bottom-up, LC-MS/MS) маркеров, ассоциированных со степенью патогистологической градации (G1, G2, G3) опухолей МЖ, а также валидацию 49 из них (локализованы в ядре, цитоплазме, плазматической мембране и межклеточном пространстве) [18], что, по мнению исследователей, позволит дополнить новыми данными существующую модель микроокружения опухоли в ходе ее прогрессии.

В лимфатических узлах пациентов с РМЖ выявлено [4] (стратегия top-down, двумерный SDS-гель-электрофорез; стратегия bottom-up, iTRAQ-2D-LC-MS/MS) и валидировано в ткани первичной карциномы МЖ пациентов с различным статусом лимфатических узлов 2 прогно-

стических протеомных маркера метастазирования РМЖ (TAGLN и TAGLN2). Эти исследования показали возможность экспрессии стромой опухоли белков, которые могут быть рассмотрены в качестве релевантных протеомных маркеров метастазирования для успешного использования их в клинике.

Современные возможности функциональной протеомики способны обеспечить решение задачи прогнозирования патологического ответа на неоадьювантную системную терапию у пациентов с РМЖ. Так, в результате протеомного мета-анализа опухолевого материала валидировано панель из 10-ти предиктивных биомаркеров прогнозирования патологического ответа на неоадьювантную таксановую и антрациклин-таксановую системную терапию (ER, PR, HER2, HER2p1248, BCL2, GATA3, EIG121, EGFR, CCNB1, CCNE1) [11]. Кроме этого, идентифицировано белки (масс-пики: m/z 7973, m/z 4405, m/z 3274, m/z 3073), связанные с безрецидивным течением заболевания после адьювантной химиотерапии [6]. С использованием IMAC-SELDI-TOF MS (для профилирования на уровне белка) и MALDI-TOF/TOF MS (для профилирования на уровне пептидов) были исследованы в послеоперационном периоде образцы сыворотки крови пациентов с первичным РМЖ и метастазами в лимфатических узлах [6]. Полученные результаты позволяют стратифицировать пациентов для назначения неоадьювантной [11] и адьювантной [6] системной химиотерапии.

Кроме того, подходы к протеомному анализу с использованием результатов геномного и транскриптомного профилирования, занесенных в базы данных, позволило сделать несколько успешных попыток [32, 33] по валидированию биомаркеров протоковых (KIFAP3, RRBP1), а также и лобулярных карцином МЖ (RRBP1), которые могут быть применены в клинической практике.

Применение выявленных протеомных маркеров с целью мониторинга течения заболевания позволит определить успешность хирургического вмешательства (снижение концентрации онкомаркеров), наличие рецидива и отдаленных метастазов (повышение концентрации онкомаркеров). Тенденции и ширина спектра применения протеомного анализа в исследованиях РМЖ указывают на перспективность использования технологии LC-MS/MS в клинической практике в качестве диагностической.



### Улучшение качества исследований протеома РМЖ

Поскольку исследования протеома и пептидома РМЖ с целью поиска маркеров диагностики и прогноза являются динамично развивающейся областью, особенно в отношении идентификации и валидации клинически значимых результатов, то актуальным является вопрос совершенствования методологических и технических подходов к проведению анализа. Примерами реализации таких инноваций может служить комбинирование существующих методических стратегий и разработка новых аналитических платформ.

**Комбинированные стратегии.** Преимущества и недостатки использования стратегий bottom-up и top-down для различных задач, а также целесообразность их применения в отношении протеомного анализа и квантификации протеома рассмотрены в ряде работ (см., напр., [34]). Так, проведена оценка взаимодополнения этих стратегий с использованием комбинации LC-MS/MS на материале ксенотрансплантатов мышей, происходящих из базального и люминального В молекулярных подтипов РМЖ [17]. Исследование проводилось как в направлении тестирования квантификационной, свободной от мечения, протеомной платформы top-down (поскольку метод LC-MS/MS применяется преимущественно с bottom-up), так и в направлении сравнительного анализа дифференциальной экспрессии белков и их протоформ с низкой молекулярной массой (<30 кДа). Сравнительный анализ эффективности использования стратегий bottom-up и top-down подтвердил преобладание bottom-up относительно идентификации 49185 групп пептидов и квантификации, полученных из них 3519 белков, против 982 протоформ к 358 белкам, полученным с помощью top-down. Также bottom-up в 8 раз точнее идентифицирует белки с молекулярным весом 0–30 кДа. Однако, количественная результативность стратегий соотносится как 60:40, причем, top-down дает возможность получить уникальную информацию относительно пептидов, дополняющую уже полученную с помощью bottom-up. Посредством разработки специального программного обеспечения (ПО) проведено валидацию результатов. Доказывается приоритетность комбинации стратегий bottom-up и top-down для исследований протеома РМЖ с привлечением геномной информации, а также подтверждается невозможность идентификации

различий некоторых пост-трансляционных модификаций (например, фосфорилирования) при использовании bottom-up.

**Аналитическая платформа in silico.** Исследования опухолевого пептидома (внутри- и межклеточные продукты деградации белка) имеет определенный потенциал для идентификации маркеров протеолитических процессов. При использовании комбинации LC-MS/MS разработана [16] аналитическая платформа in silico, которая вместе с усовершенствованным протоколом получения пептидов, дополняет результаты bottom-up. Так, проведен комплексный анализ пептидома рака яичников и ксенотрансплантатов базального и люминального РМЖ. Даная платформа in silico – это новый технологический этап для определения молекулярных особенностей и функциональной значимости пептидомной/деградомной активности в опухолевой ткани. Она характеризуется высокой пропускной способностью при проведении квантификации идентифицированных пептидов. С применением этой платформы идентифицированы пептидомные профили, отражающие результат действия опухоль-ассоциированных протеаз, и с помощью специального ПО проведена валидация результатов. Созданная аналитическая платформа и полученные данные имеют практическое значение для профилирования различных опухолей, поскольку аберрантная деградация белков присуща многим из них.

### Методы верификации и валидации результатов протеомных исследований

Поскольку валидация – это дополнительное подтверждение идентифицированных белков в качестве релевантных онкомаркеров на этапах скрининга, диагностики, прогноза и терапии, значение таких обязательных этапов исследований как верификация и валидация тяжело переоценить. Выполняется верификация и валидация результатов экспериментальных работ на значительном количестве материала с применением комплексных методов на основе: ИНС, ТМА и MS (методы SRM/MRM-MS), преимуществами и недостатками которых детально описаны [35]. Комбинация методов валидации ИНС/ТМА получила широкое применение [4, 32, 33], в связи с возможностью минимизировать объем образца по сравнению с классическими методами на основе ТМА [35]. Распространёнными методами являются Вестерн блот (Western blot) [7, 12] и MRM-MS [12, 36], а менее применяемыми – SRM-MS [30], mTRAQ-SRM MS [4], ИНС [13],



RPPA [11] и ELISA [29]. Тенденция использования нескольких методов в одном исследовании обусловлена целью повышения достоверности полученных результатов (Western blot с MRM-MS [12], mTRAQ-SRM MS с ИHC/TMA [4], Western blot с ИHC [7]). Стоит отметить применение RPPA [11] как метода валидации при про-

ведении мета-анализа (n = 712) протеома РМЖ. Также все чаще используют программные инструменты *in silico* [10, 16, 17]. Успешно валидированные результаты исследований протеома, можно ожидать, будут применяться в качестве клинически значимых онкомаркеров [4, 7, 11, 13, 29, 32, 33].

### Висновки

В целом, рассмотренные тенденции современных направлений и подходов к анализу онкопротеома свидетельствуют о перспективности использования протеомного профилирования разнообразного биологического материала и получения белковых сигнатур с целью прогресса профилактики, скрининга, диагностики, прогноза и терапии РМЖ. Анализ данных экспери-

ментальных работ указывает на важную роль современных стратегий и методических подходов с привлечением LC-MS/MS в качестве основных при проведении идентификации белковых маркеров РМЖ. Прогресс методов валидации способствует применению проверенных биомаркеров РМЖ в качестве клинически значимых.

### References (список літератури)

1. Global Health Observatory - Retrieved from: [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/cancer](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer)
2. [Bulletin of National Cancer Registry number 17 "Cancer in Ukraine, 2014-2015"] *Byuleten` Nacional`nogo kancer-reyestru # 17 "Rak v Ukrayini, 2014-2015"*. Kyiv 2016:1-142 p. (In Ukrainian).
3. Таіпов МА, Нікіфорова ЗН, Шевченко ВЕ. [Proteomic research aimed at finding breast cancer markers (review)]. *Proteomnye issledovaniya, napravlennye na poisk markerov raka molochnoj zhelezy (obzor literatury). Opuholi zhenskoy reproduktivnoj sistemy*. 2015; Vol. 2:8-18. (in Russian).
4. Dvořáková M, Jeřábková J, Procházková I, et al. Transgelin is upregulated in stromal cells of lymph node positive breast cancer. *J Proteomics*. 2016; Vol. 132:103-111.
5. Liu NQ, Stingl C, Look MP, et al. Comparative proteome analysis revealing an 11-protein signature for aggressive triple-negative breast cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2014; 106(2): djt376
6. Gast MCW, Zapatka M, van Tinteren H, et al. Postoperative serum proteomic profiles may predict recurrence-free survival in high-risk primary breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2011; 137(12): 1773-1783.
7. Beretov J, Wasinger VC, Millar EK, et al. Proteomic analysis of urine to identify breast cancer biomarker candidates using a label-free LC-MS/MS approach. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0141876.
8. Fry SA, Afrough B, Lomax-Browne HJ, et al. Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers. *Glycobiology*. 2011; 21(8): 1060–1070.
9. Espina V, Wulfkühle J, Liotta LA. Application of laser microdissection and reverse-phase protein microarrays to the molecular profiling of cancer signal pathway networks in the tissue microenvironment. *Clin. Lab. Med.* 2009; 29(1): 1-13.
10. Tyanova S, Albrechtsen R, Kronqvist P, et al. Proteomic maps of breast cancer subtypes. *Nat. Commun.* 2016; Vol. 7: 10259.
11. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Meric-Bernstam F, et al. Functional proteomics can define prognosis and predict pathologic complete response in patients with breast cancer. *Clin. Proteomics*. 2011; 8(1): 11.
12. Lawrence RT, Perez EM, Hernández D, et al. The proteomic landscape of triple-negative breast cancer. *Cell. Rep.* 2015; 11(4): 630-644.
13. He J, Whelan SA, Lu M, et al. Proteomic-based biosignatures in breast cancer classification and prediction of therapeutic response. *Int. J. Proteomics*. 2011; Vol. 2011: 1-16.
14. Zhang F, Chen JY. Breast cancer subtyping from plasma proteins. *BMC Med. Genomics*. 2013; 6(Suppl 1):S6.
15. Pendharkar N, Gajbhiye A, Taunk K, et al. Quantitative tissue proteomic investigation of invasive ductal carcinoma of breast with luminal B HER2 positive and HER2 enriched subtypes towards potential diagnostic and



- therapeutic biomarkers. *J. Proteomics*. 2016; Vol. 132: 112-30.
16. Xu Z, Wu C, Xie F, et al. Comprehensive quantitative analysis of ovarian and breast cancer tumor peptidomes. *J. Proteome Res*. 2014; 14(1): 422-33.
17. Ntai I, LeDuc RD, Fellers RT, et al. Integrated bottom-up and top-down proteomics of patient-derived breast tumor xenografts. *Mol. Cell. Proteomics*. 2016; 15(1): 45-56.
18. Olsson N, Carlsson P, James P, et al. Grading breast cancer tissues using molecular portraits. *Mol. Cell. Proteomics*. 2013; 12(12): 3612-23.
19. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, et al. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS*. 2011; 15(6): 353-361.
20. Maller O, Hansen KC, Lyons TR, et al. Collagen architecture in pregnancy-induced protection from breast cancer. *J. Cell. Sci*. 2013; 126(18): 4108-10.
21. Schedin P, Mitrenga T, McDaniel S and Kaeck M. Mammary ECM composition and function are altered by reproductive state. *Mol. Carcinog*. 2004; 41: 207-220.
22. Lu P, Weaver VM and Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol*. 2012; 196: 395-406.
23. Schedin P and Keely PJ. Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2011; 3:a003228.
24. Maller O, Martinson H and Schedin P. Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2010; 15: 301-318.
25. Lyons TR, O'Brien J, Borges VF, et al. Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX-2. *Nat. Med*. 2011; 17: 1109-1115.
26. Levental KR, Yu H, Kass L, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009; 139: 891-906.
27. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC. Med*. 2008; 6: 11.
28. Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol*. 2011; 178: 1221-1232.
29. Fry SA, Sinclair J, Timms JF, et al. A targeted glycoproteomic approach identifies cadherin-5 as a novel biomarker of metastatic breast cancer. *Cancer Lett*. 2013; 328(2): 335–344.
30. Coskun E, Jaruga P, Reddy PT, et al. Extreme expression of DNA repair protein apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) in human breast cancer as measured by liquid chromatography and isotope dilution tandem mass spectrometry. *Biochemistry*. 2015, 54(38):5787-90.
31. Groessl M, Slany A, Bileck A, et al. Proteome profiling of breast cancer biopsies reveals a wound healing signature of cancer-associated fibroblasts. *J. Proteome Res*. 2014; 13(11): 4773-4782.
32. Telikicherla D, Maharudraiah J, Pawar H, et al. Overexpression of kinesin associated protein 3 (KIFAP3) in breast cancer. *J. Proteomics Bioinform*. 2012; 5(5): 122-126.
33. Telikicherla D, Marimuthu A, Kashyap MK, et al. Overexpression of ribosome binding protein 1 (RRBP1) in breast cancer. *Clin. Proteomics*. 2012; 9(1): 7.
34. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng*. 2009; Vol. 11: 49-79.
35. Gromov P, Moreira JMA, Gromova I. Proteomic analysis of tissue samples in translational breast cancer research. *Expert Rev. Proteomics*. 2014; 11(3): 285-302.
36. Riley CP, Zhang X, Nakshatei H, et al. A large, consistent plasma proteomics data set from prospectively collected breast cancer patient and healthy volunteer samples. *J. Transl. Med*. 2011; 9(1): 80.

(received 06.03.2017, published online 29.03.2017)

(одержано 06.03.2017, опубліковано 29.03.2017)

