

Многopараметрический иммуногистохимический анализ в диагностике онкологических заболеваний (обзор литературы)

И.Р. Набиев^{1,2}, М.А. Барышникова³, З.А. Соколова³, П.М. Соколов^{2,4}, А.В. Караулов²

¹Университет Реймса Шампань-Арденн; Франция, 51100 Реймс, ул. Когнак Жэ, 51;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119992 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴LIFT (Life Improvement by Future Technologies) Центр; Россия, 121205 Москва, Сколково, ул. Нобеля, 5

Контакты: Игорь Руфаилович Набиев igor.nabiev@gmail.com

Введение. Многopараметрический сравнительный анализ клинических и молекулярно-генетических биомаркеров злокачественных новообразований обладает мощным диагностическим и прогностическим потенциалом и является необходимой предпосылкой для развития персонализированной медицины. Данный подход позволяет не только одновременно выявить экспрессию определенных биомаркеров опухоли, но и получить данные об их пространственном распределении в исследуемых тканях, а также оценить взаимное расположение клеток опухоли и ее микроокружения, экспрессирующих те или иные биомаркеры. Таким образом, многopараметрический иммуногистохимический анализ, позволяющий не только подтвердить наличие определенной нозологии, но и провести 3D-визуализацию биопатов, изучить пространственную организацию опухолевой ткани и уровни экспрессии биомаркеров на уровне единичных клеток, может открыть широкие перспективы в диагностике и лечении онкологических заболеваний.

Цель исследования – систематизировать данные о возможностях многopараметрического иммуногистохимического анализа для диагностики и развития персонализированного подхода к терапии онкологических заболеваний.

Результаты. Многopараметрический иммуногистохимический анализ дает возможность оценивать гетерогенность опухолей на уровне молекулярных подтипов, а также гетерогенность опухолевого микроокружения, таким образом позволяет прогнозировать развитие опухоли, определить ее метастатический потенциал, а также выбрать эффективную стратегию для подбора индивидуальной терапии.

Заключение. В настоящем обзоре проанализированы результаты использования многopараметрического иммуногистохимического анализа для детекции онкологических заболеваний, показан высокий потенциал этого метода для дифференциации онкологических нозологий и исследования микроокружения опухолей, что позволяет эффективно выбрать терапевтическую стратегию и оценить ответ опухоли на терапию.

Ключевые слова: многopараметрическая детекция, иммуногистохимический анализ, иммунофлуоресценция, биомаркеры рака, микроокружение опухоли

Для цитирования: Набиев И. Р., Барышникова М. А., Соколова З. А. и др. Многopараметрический иммуногистохимический анализ в диагностике онкологических заболеваний (обзор литературы). Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):10–6. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-10-16>

Multiparametric immunohistochemical analysis in cancer diagnosis (literary review)

Igor R. Nabiev^{1,2}, Maria A. Baryshnikova³, Zinaida A. Sokolova³, Pavel M. Sokolov^{2,4}, Alexander V. Karaulov²

¹Université de Reims Champagne-Ardenne; 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France;

²Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); bld. 2, 8 Trubetskaya St., 119146 Moscow, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

⁴Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, 5 Nobelya St., Skolkovo, 121205 Moscow, Russia

Contacts: Igor Rufailovich Nabiev igor.nabiev@gmail.com

Introduction. Multiparametric comparative analysis of clinical and molecular genetic biomarkers of malignant tumors has strong diagnostic and prognostic potentials and is a prerequisite for the development of personalized medicine. This approach makes it possible not only to simultaneously detect the expression of several tumor biomarkers, but also to obtain data on their spatial distribution in tissues examined, as well as to estimate the mutual location of tumor cells and tumor microenvironment expressing specific biomarkers. Thus, multiparametric immunohistochemical analysis (IHCA), which allows not only confirming the specific disease, but also carrying out 3D imaging of biopsy specimens and analyzing the spatial organization of tumor tissue, as well as the expression rates of biomarkers at the level of individual cells, opens wide prospects in the diagnosis and treatment of cancer.

Aim. Systematizing data on the potential of multiparametric IHCA for cancer diagnosis and development of the personalized approach to cancer therapy.

Results. Multiparametric IHCA allows estimating the heterogeneity of the tumor at the level of molecular subtypes, as well as the heterogeneity of the tumor microenvironment. These data make it possible to predict tumor development, determine its metastatic potential, and select an effective strategy for individual therapy.

Conclusion. This review analyzes the use of multiparametric IHCA for the detection of malignant tumors and shows its high potential for the differentiation of tumors and the study of tumor microenvironment. This ensures effective selection of the therapeutic strategy and accurate assessment of the response to therapy.

Keywords: multiparametric detection, immunohistochemical analysis, immunofluorescence, cancer biomarkers, tumor microenvironment

For citation: Nabiev I.R., Baryshnikova M.A., Sokolova Z.A. et al. Multiparametric immunohistochemical analysis in cancer diagnosis (literary review). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):10–6. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-10-16>

Введение

Определение тканевых биомаркеров широко используется в дифференциальной диагностике онкологических заболеваний с целью классификации типов и подтипов опухолей, оценки прогноза, а также для выбора эффективной терапевтической стратегии [1, 2]. Тем не менее с развитием персонализированной медицины увеличивается потребность в индивидуальном подходе к высокочувствительной ранней детекции и получении дополнительной информации о динамике опухолевого роста. В научной литературе имеются данные об успешном использовании омиксных технологий, которые могут иметь потенциальное значение для будущего развития онкологии, например сравнительный анализ маркеров микробиоты в цельной крови и тканях [3], или протеомный анализ образцов крови пациентов с целью составления атласа количественного содержания белков в крови при определенных онкологических нозологиях и выявления корреляции с помощью искусственного интеллекта [4]. Необходимость исследования более широкого числа биомаркеров также обусловлена развитием таргетной терапии и иммунотерапии, для назначения которых требуется более точное профилирование опухолевых тканей (ОТ) и клеток (ОК) микроокружения опухоли (МО). Вместе с тем золотым стандартом в клинической диагностике для подтверждения диагноза остается иммуногистохимический (ИГХ) анализ ОТ. Логичным развитием стандартного ИГХ-анализа стало появление методов многопараметрического ИГХ-окрашивания, что в немалой степени обусловлено накоплением

данных, свидетельствующих о высокой гетерогенности опухолей и их МО, открытием новых биомаркеров, а также необходимостью пространственной визуализации распределения множества биомаркеров опухоли и ее МО на уровне единичных клеток [5]. Таким образом, в последние несколько лет прогрессивно увеличивается интерес к возможностям многопараметрического ИГХ-анализа для исследования различных видов злокачественных новообразований (см. таблицу).

Дифференциация опухолевых клеток и микроокружения опухоли

Установление типа и подтипа рака требует детекции нескольких биомаркеров. Например, установление таких молекулярных подтипов рака молочной железы (РМЖ), как HER2⁺, люминальный А, люминальный В (HER2⁺ или HER2⁻) и тройной негативный подтип, может быть основано на детекции панели биомаркеров, состоящей из HER2, эстрогенового рецептора (ER), прогестеронового рецептора (PR) и Ki67. Детекция EGFR и базальных цитокератинов (CK14 и CK5/6) может помочь в идентификации тройного негативного подтипа и уточнить прогноз развития опухоли [14]. А.М. Cheung и соавт. исследовали ОТ РМЖ, однако, кроме стандартных биомаркеров ER, PR, HER2, Ki67, для исследования гетерогенности опухоли внутри существующих молекулярных подтипов РМЖ они использовали дополнительные биомаркеры: TP53, CDKN1A (P21/WAF1), CDKN2A (P16INK4A), CD8 и CD20 [6]. Для проведения многопараметрической ИГХ-количественной детекции

Использование многопараметрического иммуногистохимического анализа в онкологии

The use of multiparametric immunohistochemical analysis in oncology

Тип рака Type of cancer	Детектируемые биомаркеры/принцип детекции Detected markers/detection principle	Преимущества Advantages	Источник Source
Дифференциация опухолевых клеток и микроокружения опухоли Differentiation of tumor cells and the tumor microenvironment			
Рак молочной железы Breast cancer	ER, PR, HER2, Ki67, TP53, CDKN1A (P21/WAF1), CDKN2A (P16INK4A), CD8, CD20. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет проводить изучение гетерогенности опухолей внутри молекулярных подтипов The possibility of studying the tumor heterogeneity within molecular subtypes	[6]
Рак молочной железы Breast cancer	ER, PR, HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD20, CD68, pan-CK, H2A.X. Масс-спектрометрическая детекция Mass spectrometry detection	Позволяет определять гистологический тип рака молочной железы и детектировать иммунные клетки микроокружения клеток The possibility of determining the histological type of breast cancer and detecting immune cells in the tumor microenvironment	[7]
Профилирование иммунных клеток микроокружения клеток Profiling immune cells of the tumor microenvironment			
Немелкоклеточный рак легкого Non-small-cell lung cancer	PD-L1, CD68, CD8, CK. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет дифференцировать PD-L1 ⁺ -клетки среди макрофагов, Т-лимфоцитов и опухолевых клеток The possibility of differentiating PD-L1 ⁺ cells among macrophages, T cells, and tumor cells	[8]
Рак молочной железы Breast cancer	PD-L1, CD3, CD8, CK, FoxP3, CD163. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет дифференцировать PD-L1 ⁺ -клетки среди хелперных Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, макрофагов, регуляторных Т-лимфоцитов и опухолевых клеток The possibility of differentiating PD-L1 ⁺ cells among T helper cells, cytotoxic T cells, macrophages, regulatory T cells, and tumor cells	[9]
Колоректальный рак Colorectal cancer	CD4, CD8, CD20, FoxP3, CD45RO, CD3, NKp46, CD56, CD68, CD163, CD1a, CD208, CD123, CD15, CK. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет дифференцировать 15 типов иммунных клеток микроокружения опухоли, выявляя подклассы Т-лимфоцитов, включая CD4 ⁺ - и CD8 ⁺ -лимфоциты, регуляторные Т-лимфоциты и естественные киллеры, а также В-лимфоциты, М1- и М2-макрофаги, миелоидные клетки и плазматоидные дендритные клетки The possibility of differentiating 15 types of immune cells of the tumor microenvironment and identify T cell subtypes, including CD4 ⁺ and CD8 ⁺ lymphocytes, regulatory T cells, and natural killer cells, as well as B cells, M1 and M2 macrophages, myeloid cells, and plasmacytoid dendritic cells	[10]
Диагностика и прогноз Diagnosis and prognosis			
Колоректальный рак Colorectal cancer	CD133, HER2, PD-L1, CD68. Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Детекция уровня экспрессии потенциальных биомаркеров CD133 и PD-L1 позволяет проводить дифференциальную диагностику на ранней стадии развития опухоли. При этом уровень экспрессии биомаркера HER2 может служить индикатором агрессивности опухолевого роста, а детекция биомаркера CD68 уточняет метастатический потенциал опухоли Estimation of the expression rate of the CD133 and PD-L1 potential markers enables differential diagnosis at the early stage of tumor growth. The HER2 marker expression rate can serve as an indicator of aggressive tumor growth, and the detection of the CD68 marker allows more accurate estimation of the tumor metastatic potential	[11]

Окончание таблицы
End of table

Тип рака Type of cancer	Детектируемые биомаркеры/принцип детекции Detected markers/detection principle	Преимущества Advantages	Источник Source
Плоскоклеточная карцинома шеи и головы Squamous cell carcinoma of the head and neck	PD-1, CD3, ROR γ t, CD56, CD8, T-bet, GATA-3, FoxP3, PD-L1, CD20, CD45, p16, Tryptase, CD68, CSF1R, DC-SIGN, CD66b, CD83, CD163, МНС II, CD3/20/56. Серийная хромогенная детекция Sequential chromogenic detection	Позволяет выявить дифференциальные иммунные профили, основанные на детекции лимфоидных и миелоидных клеток, коррелирующих со статусом вируса папилломы человека и прогнозом онкозаболевания The possibility of identifying differential immune profiles based on the detection of lymphoid and myeloid cells correlated with the human papilloma virus status and cancer prognosis	[12]
Аденокарцинома легкого Pulmonary adenocarcinoma	CD31, коллаген тип IV CD31, type IV collagen, TTF-1 и E-кадгерин TTF-1 and E-cadherin Флуоресцентная детекция Fluorescence detection	Позволяет определить пространственную архитектуру кластеров опухолевых клеток в паренхиме легкого и воздушном пространстве альвеол, а также предсказать частоту рецидивов и выживаемость пациентов с ограниченной резекцией The possibilities of determining the spatial architecture of tumor cell clusters in the lung parenchyma and alveolar air space and predicting the relapse rate and survival of patients after limited resection.	[13]

авторы применяли конъюгаты антител с флуоресцентными красителями (ФРК) Cy3 и Cy5, при этом после детекции определенной пары биомаркеров проводили инактивацию ФРК и последовательно окрашивали следующую пару. Таким образом проанализировано 225086 единичных клеток в 101 участке срезов ОТ 59 пациентов, что позволило выделить высокую гетерогенность и пространственную изменчивость опухолей внутри классических молекулярных подтипов. Эти результаты свидетельствуют о необходимости более точной дифференциации РМЖ на основе определения уровней экспрессии биомаркеров и оценки корреляции с клиническими данными, что позволит улучшить точность фенотипирования РМЖ и прогнозирование ответа на персонализированную терапию. G. Yagnik и соавт. в недавнем исследовании предложили метод одновременной детекции сразу 12 тканевых биомаркеров, включая классические биомаркеры РМЖ – ER, PR, HER2 и Ki67; биомаркеры иммунных клеток – CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD20 и CD68; цитокератины и биомаркер клеточного ядра H2A.X (гистон H2A.X) [7]. Для многопараметрической детекции использован метод масс-спектрометрической детекции (МСД), основанный на детекции пептидных меток заданной молекулярной массы в плоскости среза ткани с помощью масс-спектрометра. Для осуществления детекции предварительно были получены конъюгаты антител, специфически распознающих определенные биомаркеры с маркерным пептидом. Мультиплексность оптических методов детекции, как правило, ограничена спектральными свойствами используемых органических

ФРК, в то время как разрешение метода МСД позволяет детектировать метки, отличающиеся по массе менее чем на 1 Да, обеспечивая возможность одновременной детекции неограниченного количества тканевых биомаркеров. Однако пространственное разрешение МСД составляет всего 1,4 мкм, что существенно хуже пространственного разрешения оптических методов, разрешение которых составляет 0,2 мкм и менее. Между тем примененный подход позволил всего на одном образце ОТ определить все маркеры, необходимые как для определения молекулярных подтипов РМЖ, так и для детекции различных типов иммунных клеток МО.

Профилирование иммунных клеток микроокружения опухоли

Открытие сигнального пути PD-1/PD-L1 произвело революцию в терапии многих видов онкологических заболеваний. На данный момент одобрены 6 препаратов на основе антител, ингибирующих этот сигнальный путь, а также проходят более 10000 клинических исследований препаратов, нацеленных на него [15]. Показано, что одновременная детекция PD-L1⁺-опухолевых клеток и PD-L1⁺-иммунных клеток может улучшить эффективность и правильность подбора иммунотерапии [16]. Однако для точного типирования клеток опухоли и МО при проведении ИГХ-анализа опухоли необходимо проводить одновременное определение 2 и более биомаркеров, чтобы дифференцировать PD-L1⁺-клетки опухоли и PD-L1⁺-клетки МО. Так, F. Abdullahi Sidi и соавт. успешно провели одновременную детекцию PD-L1,

CD68 (маркера макрофагов), CD8 (маркера Т-лимфоцитов) и СК (маркера эпителиальных клеток) с помощью конъюгат соответствующих антител и ФРК семейства Oral™, используя клинические образцы ОТ пациентов с немелкоклеточным раком легкого [8]. Авторами также выполнено сравнение многопараметрической флуоресцентной детекции биомаркеров со стандартным ИГХ-окрашиванием с помощью 3,3'-диаминобензидина и показано, что совпадение результатов составляет более 95 %.

К. Sanchez и соавт. использовали метод многопараметрического иммуофлуоресцентного окрашивания для исследования изменений МО на ранних стадиях РМЖ [9]. Для этого был выбран набор из 6 тканевых биомаркеров: СК, CD3, CD8, FoxP3, CD163 и PD-L1, а для одновременной иммуодетекции использовали ФРК набора Oral™, а также тирамидную систему амплификации сигнала (PerkinElmer Inc., США). Одновременная детекция данных биомаркеров позволила точно дифференцировать ОК (СК⁺), хелперные Т-лимфоциты (CD3⁺, CD8⁻), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺, CD8⁺), макрофаги (CD163⁺) и регуляторные Т-лимфоциты (CD3⁺, FoxP3⁺) среди PD-L1⁺-клеток. Показано, что уровень экспрессии PD-L1 и пространственное распределение иммунных клеток в МО опухоли коррелируют с контрольными клиническими исследованиями. Кроме того, достигнутое высокое разрешение при определении внутриопухолевой гетерогенности позволяет детектировать фармакодинамические изменения, связанные с проведенной терапией. Данный метод также можно использовать для оценки других особенностей иммунного ответа, например связанных с лечением изменений в клеточном соотношении и кластеризации иммунных клеток в ОТ. В отличие от детекции экспрессии только биомаркера PD-L1, комплексный ИГХ-анализ потенциально может использоваться в качестве прогностического подхода при неоадьювантной терапии анти-PD-1/L1 в сочетании с химиотерапией [17].

А. Mezheyski и соавт. проведено масштабное ИГХ-изучение 5968 срезов ОТ пациентов с колоректальным раком (КРР) [10]. Для флуоресцентного ИГХ-анализа авторами использованы 3 панели антител, распознающих: 1) биомаркеры лимфоцитов (CD4, CD8, CD20, FoxP3, CD45RO и СК), 2) биомаркеры естественных киллеров/макрофагов (CD3, NKp46, CD56, CD68, CD163 и СК), 3) биомаркеры дендритных клеток (CD1a, CD208, CD123, CD15, CD3, CD68 и СК), что позволило дифференцировать 15 различных подтипов иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, а именно: хелперные Т-лимфоциты (CD4⁺), Т-лимфоциты памяти (CD4⁺, CD45RO⁺), регуляторные Т-лимфоциты (CD4⁺, FoxP3⁺, CD45RO^{+/+} и (CD8⁺, FoxP3⁺, CD45RO^{+/+}), цитотоксические Т-лим-

фоциты (CD8⁺), эффекторные Т-лимфоциты памяти (CD8⁺, CD45RO⁺); В-лимфоциты (CD20⁺); естественные киллеры (NKp46⁺, CD56⁺), киллерные Т-лимфоциты (CD3⁺, NKp46⁺, CD56⁺), M1-макрофаги (CD68⁺), M2-макрофаги (CD68⁺, CD163⁺); миелоидные клетки (CD163⁺); незрелые дендритные клетки (CD1a⁺), зрелые дендритные клетки (CD1a⁺, CD208⁺) и плазматоидные дендритные клетки (CD123⁺). Столь детальное профилирование МО и дифференцирование КРР по установленным критериям, а также анализ корреляций с клиническими данными дали возможность получить прогностическую модель, позволяющую оценить выживаемость пациентов, а также более точно дифференцировать рак толстой кишки и рак прямой кишки. Известно, что количество CD3⁺- и CD8⁺-клеток в ОТ влияет на выживаемость пациентов [18], однако проведенный многопараметрический ИГХ-анализ А. Mezheyski и соавт. [10] позволил установить еще один важный тканевый прогностический биомаркер – количество M2-макрофагов.

Диагностика и прогноз

W. Zhang и соавт. использовали многопараметрический ИГХ-анализ для поиска новых биомаркеров КРР [11]. Для этого авторами проведено количественное определение биомаркеров CD133, HER2, PD-L1 и CD68 в образцах срезов ОТ 84 пациентов с КРР, и полученные результаты проанализированы в сопоставлении с имеющимися клиническими данными исследуемых больных. Для усиления чувствительности флуоресцентной детекции авторами использована тирамидная система амплификации сигнала (PerkinElmer Inc., США). Полученные результаты продемонстрировали то, что детекция биомаркеров CD133 и PD-L1 у пациентов с КРР наиболее информативна на ранней стадии развития опухоли, а детекция биомаркеров HER2 и CD68 – на поздних стадиях. Помимо этого, повышенная экспрессия биомаркера HER2 может служить индикатором агрессивности КРР, а степень экспрессии биомаркера CD68 потенциально может коррелировать с метастатическим потенциалом КРР. Еще одним примером широких возможностей многопараметрического ИГХ-анализа может служить исследование Т. Tsujikawa и соавт., которые провели одновременный количественный анализ биомаркеров лимфоидных и миелоидных клеток в 38 образцах тканей пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи. Для проведения ИГХ-анализа использовалась хромогенная система детекции с последовательным серийным окрашиванием [12]. Дифференциальный количественный анализ тканей проводили с использованием антител, позволяющих специфически распознавать биомаркеры лимфоидных клеток: PD-1, CD3, RORgt, CD56, CD8, T-bet, GATA-3, FoxP3, PD-L1, CD20, CD45, p16 – и биомаркеры

миелоидных клеток: Tryptase, CD68, CSF1R, DC-SIGN, CD66b, CD83, CD163, МНС II, PD-L1, CD3/20/56, CD45, p16. Проведенное исследование выявило коррелирующий с неблагоприятным прогнозом заболевания профиль иммунных клеток МО, а также оно позволило идентифицировать особенности профиля иммунных клеток у онкологических пациентов с вирусом папилломы человека.

Аналогичные исследования фенотипа лимфоидных и миелоидных клеток, проведенные авторами при изучении 24 образцов тканей больных аденокарциномой поджелудочной железы после неoadъювантной вакцинотерапии GVAX, позволили установить профиль иммунных клеток, соответствующий пациентам с неблагоприятным прогнозом. Таким образом, данные многопараметрического ИГХ-анализа подтвердили тезис о том, что иммунный контекст может эффективно использоваться в качестве основы для прогноза клинических исходов и ответа на терапию злокачественных новообразований. Известно, что пространственное распределение клеток опухоли и МО имеют существенное клиническое значение. Так, Y. Yagi и соавт. использовали многопараметрическое ИГХ-окрашивание для 3D-визуализации путей миграции раковых клеток при аденокарциноме легкого [13]. 3D-реконструкцию ОТ проводили, анализируя множество последовательных срезов ОТ после иммунофлуоресцентной детекции биомаркеров: CD31, коллагена тип IV, TTF-1 и E-кадгерина, с помощью конъюгат специфических антител и ФРК семейства Alexa Fluor™. Данный подход позволил более детально изучить морфологию ОТ и идентифицировать пути распространения ОК в воздушное пространство паренхимы легкого за пределами границ основной опухоли. Результаты пространственной 3D-визуализации, совмещенной с многопараметрической детекцией,

позволили предположить, что ОК отделяются от основной опухоли и мигрируют через воздушные пространства к стенкам отдаленных альвеол, где вновь присоединяются к ним путем кооптации сосудов. Способность клеток опухоли вновь прикрепляться к стенкам альвеол после миграции из основной опухоли может служить объяснением более высокой частоты рецидивов и худшей выживаемости пациентов, перенесших сегментэктомию легкого, по сравнению с теми пациентами, кому была выполнена лобэктомия.

Заключение

Многопараметрическая ИГХ-детекция биомаркеров может быть осуществлена с использованием различных подходов: от последовательного окрашивания хромогенными красителями и использования методов МСД до применения различных ФРК с последовательным или одновременным окрашиванием срезов опухолей и последующей 3D-реконструкцией архитектуры ОТ. Многопараметрический подход к ИГХ-детекции позволяет получать данные о пространственной организации клеток опухоли и ее МО и проводить фенотипирование различных типов клеток, используя малое количество ОТ, генерируя массивы данных, которые можно анализировать как в ручном, так и в автоматическом режимах с применением достижений искусственного интеллекта и нейросетей [19]. Таким образом, многопараметрический ИГХ-анализ открывает обширные перспективы для высокоточной дифференциальной детекции онкологических заболеваний, персонализированного подхода в выборе терапевтической стратегии, мониторинга эффективности терапии, а также может быть использован для исследования механизмов канцерогенеза и поиска новых значимых молекулярных онкомаркеров.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Füzéry A.K., Levin J., Chan M.M., Chan D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: Issues and challenges. *Clin Proteomics* 2013;10(1):13. DOI: 10.1186/1559-0275-10-13
- Landegren U., Hammond M. Cancer diagnostics based on plasma protein biomarkers: Hard times but great expectations. *Mol Oncol* 2021;15(6):1715–26. DOI: 10.1002/1878-0261.12809
- Poore G.D., Kopylova E., Zhu Q. et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature* 2020;579(7800):567–74. DOI: 10.1038/s41586-020-2095-1
- Álviz M.B., Edfors F., von Feilitzen K. et al. Next generation pan-cancer blood proteome profiling using proximity extension assay. *Nat Commun* 2023;14(1):4308. DOI: 10.1038/s41467-023-39765-y
- Sheng W., Zhang C., Mohiuddin T.M. et al. Multiplex immunofluorescence: A powerful tool in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2023;24(4):3086. DOI: 10.3390/ijms24043086
- Cheung A.M., Wang D., Liu K. et al. Quantitative single-cell analysis of immunofluorescence protein multiplex images illustrates biomarker spatial heterogeneity within breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):114. DOI: 10.1186/s13058-021-01475-y
- Yagnik G., Liu Z., Rothschild K.J., Lim M.J. Highly multiplexed immunohistochemical MALDI-MS imaging of biomarkers in tissues. *J Am Soc Mass Spectrom* 2021;32(4):977–88. DOI: 10.1021/jasms.0c00473

8. Abdullahi Sidi F., Bingham V., Craig S.G. et al. PD-L1 multiplex and quantitative image analysis for molecular diagnostics. *Cancers (Basel)* 2020;13(1):29. DOI: 10.3390/cancers13010029
9. Sanchez K., Kim I., Chun B. et al. Multiplex immunofluorescence to measure dynamic changes in tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res* 2021;23(1):2. DOI: 10.1186/s13058-020-01378-4
10. Mezheyeuski A., Micke P., Martín-Bernabé A. et al. The immune landscape of colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13(21):5545. DOI: 10.3390/cancers13215545
11. Zhang W., Song Z.J., Zhang B.Y. et al. Multiplex immunohistochemistry indicates biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma* 2021;68(6):1272–82. DOI: 10.4149/neo_2021_210312N324
12. Tsujikawa T., Kumar S., Borkar R.N. et al. Quantitative multiplex immunohistochemistry reveals myeloid-inflamed tumor-immune complexity associated with poor prognosis. *Cell Rep* 2017;19(1):203–17. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.037
13. Yagi Y., Aly R.G., Tabata K. et al. Three-dimensional histologic, immunohistochemical, and multiplex immunofluorescence analyses of dynamic vessel co-option of spread through air spaces in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2020;15(4):589–600. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.12.112
14. Eliyatkin N., Yalçın E., Zengel B. et al. Molecular classification of breast carcinoma: From traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. *J Breast Health* 2015;11(2):59–66. DOI: 10.5152/tjbh.2015.1669
15. Upadhaya S., Neftelinov S.T., Hodge J., Campbell J. Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov* 2022;21(7):482–3. DOI: 10.1038/d41573-022-00030-4
16. Lu S., Stein J.E., Rimm D.L. et al. Comparison of biomarker modalities for predicting response to PD-1/PD-L1 checkpoint blockade: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2019;5(8):1195–204. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.1549
17. Schmid P., Cortes J., Pusztai L. et al. Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2020;382(9):810–21. DOI: 10.1056/NEJMoa1910549
18. Pagès F., Mlecnik B., Marliot F. et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: A prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018;391(10135):2128–39. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30789-X
19. Ghahremani P., Li Y., Kaufman A. et al. Deep learning-inferred multiplex immunofluorescence for immunohistochemical image quantification. *Nat Mach Intell* 2022;4(4):401–12. DOI: 10.1038/s42256-022-00471-x

Вклад авторов

И.Р. Набиев: дизайн обзора, подготовка текста, экспертный анализ текста;
 М.А. Барышникова: анализ источников литературы, экспертный анализ текста;
 З.А. Соколова: анализ источников литературы;
 П.М. Соколов: сбор, анализ данных литературы, подготовка текста;
 А.В. Караулов: анализ источников литературы, экспертный анализ текста.

Author's contribution

I.R. Nabiev: design of the review, validation of the text;
 M.A. Baryshnikova: analysis of literature data, validation of the text;
 Z.A. Sokolova: analysis of literature data;
 P.M. Sokolov: collection and analysis of literature data, text preparation;
 A.V. Karaulov: analysis of literature data, validation of the text.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Р. Набиев / I.R. Nabiev: <https://orcid.org/0000-0002-8391-040X>
 М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>
 З.А. Соколова / Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>
 П.М. Соколов / P.M. Sokolov: <https://orcid.org/0000-0001-5321-3753>
 А.В. Караулов / A.V. Karaulov: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Данная работа была поддержана грантом № 075-15-2021-937 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Financing. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation through the grant № 075-15-2021-937.

Статья поступила: 31.07.2023. Принята в печать: 13.10.2023.

Article received: 31.07.2023. Accepted for publication: 13.10.2023.