ISSN 2181-3187

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ИММУНОГИСТОХИМИЯ В ПАТОЛОГИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА: ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ИММУННОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ПРЕЦИЗИОННОЙ ОНКОЛОГИИ

Жуманиязова Шахноза Искандеровна
Ташкентский государственный медицинский университет
Кафедра физиологии и патологической анатомии
j.shakhnoza@tashmeduni.uz

Аннотация

Мультиплексная иммуногистохимия и иммунофлуоресценция (мИГХ/мИФ) представляют собой передовые технологии визуализации, позволяющие одновременно детектировать множественные белковые маркеры в одном гистологическом срезе с сохранением пространственного контекста. В патологии колоректального рака (КРР) эти методы обеспечивают детальное картирование иммунного микроокружения опухоли на уровне отдельных клеток, выявляя пространственные взаимодействия между опухолевыми клетками, цитотоксическими Т-лимфоцитами, регуляторными Т-клетками, макрофагами и другими компонентами иммунной системы. Пространственное иммунное профилирование с использованием мИГХ/мИФ улучшает прогностическую стратификацию пациентов, превосходя традиционную систему TNM, и позволяет предсказывать ответ на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек. Интеграция мультиплексной визуализации с методами искусственного интеллекта, пространственной транскриптомикой и мультиомными подходами открывает новые возможности для прецизионной онкологии, обеспечивая персонализированный выбор терапии на основе пространственной архитектуры иммунного микроокружения. Настоящий обзор систематизирует современные технологические платформы мИГХ/мИФ, концепции пространственного

ISSN 2181-3187

анализа, клинически значимые биомаркеры и перспективы клинического внедрения в контексте колоректального рака.

Ключевые слова: *мультиплексная иммуногистохимия, мультиплексная иммунофлуоресценция, колоректальный рак, пространственное профилирование, иммунное микроокружение опухоли, иммуноскор, прецизионная онкология, иммунотерапия, искусственный интеллект, цифровая патология*

1. Введение

Колоректальный рак (КРР) остается одной из ведущих причин онкологической смертности в мире, несмотря на значительные достижения в диагностике и лечении. Традиционная система стадирования TNM (опухоль-узлы-метастазы), основанная на анатомическом распространении заболевания, не в полной мере отражает биологическую гетерогенность КРР и не позволяет точно предсказать клинический исход или ответ на терапию у отдельных пациентов. В последние два десятилетия стало очевидно, что иммунное микроокружение опухоли (tumor immune microenvironment, TIME) играет критическую роль в прогрессировании КРР, метастазировании и ответе на лечение [1], [9].

Иммунная система способна распознавать и элиминировать опухолевые клетки, однако опухоли развивают механизмы иммунного ускользания, создавая иммуносупрессивное микроокружение. Состав, плотность и пространственная организация иммунных клеток в опухоли определяют баланс между противоопухолевым иммунитетом и иммуносупрессией. Цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, ассоциированы с благоприятным прогнозом, тогда как регуляторные Т-клетки (Tregs) и М2-поляризованные

ISSN 2181-3187

макрофаги могут способствовать иммуносупрессии и прогрессированию заболевания [5], [8].

Появление иммунотерапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (immune checkpoint inhibitors, ICI) революционизировало лечение КРР с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом системы репарации неспаренных оснований (dMMR). Однако большинство пациентов с микросателлитно-стабильным (MSS) КРР не отвечают на иммунотерапию, что подчеркивает необходимость более точных биомаркеров для стратификации пациентов [1], [11]. Традиционные методы оценки иммунного микроокружения, такие как стандартная иммуногистохимия (ИГХ) с одним маркером, не позволяют одновременно визуализировать множественные клеточные популяции и их пространственные взаимодействия.

Мультиплексная иммуногистохимия и иммунофлуоресценция (мИГХ/мИФ) представляют собой инновационные технологии, позволяющие одновременно детектировать от 6 до более 40 белковых маркеров в одном гистологическом срезе с сохранением пространственного контекста на уровне отдельных клеток [1], [2], [3], [4]. Эти методы обеспечивают детальное фенотипирование иммунных и опухолевых клеток, картирование их пространственного распределения и количественную оценку межклеточных взаимодействий. Пространственное иммунное профилирование с использованием мИГХ/мИФ позволяет выявлять прогностически значимые паттерны иммунной инфильтрации, идентифицировать иммуносупрессивные ниши и предсказывать ответ на иммунотерапию [7], [12].

Интеграция мультиплексной визуализации с методами компьютерного анализа изображений, искусственного интеллекта и машинного обучения открывает новые возможности для извлечения сложных пространственных признаков и построения прогностических моделей [3], [13]. Кроме того, сопряжение мИГХ/мИФ с пространственной транскриптомикой и другими

ISSN 2181-3187

омными технологиями обещает более глубокое понимание молекулярных механизмов, определяющих иммунное микроокружение опухоли [15], [16].

Настоящий обзор систематизирует современное состояние мультиплексной иммуногистохимии в патологии колоректального рака, охватывая технологические платформы, концепции пространственного анализа, клинически значимые биомаркеры, применение в прецизионной онкологии и перспективы клинического внедрения.

2. Технологии мультиплексной иммуногистохимии и иммунофлуоресценции

Мультиплексная иммуногистохимия и иммунофлуоресценция используют различные стратегии для одновременной детекции множественных белковых маркеров в одном гистологическом срезе. Основные подходы включают циклическую визуализацию с повторными циклами окрашивания и удаления антител, использование ДНК-баркодированных антител, тирамидную амплификацию сигнала и масс-цитометрическую визуализацию с металл-конъюгированными антителами. Каждая платформа имеет свои преимущества и ограничения в отношении количества детектируемых маркеров, пространственного разрешения, пропускной способности и сложности рабочего процесса [1], [2], [3], [4].

2.1. Платформа CODEX

CODEX (CO-Detection by indEXing) представляет собой высокомультиплексную платформу циклической иммунофлуоресценции, использующую ДНК-баркодированные антитела для достижения детекции более 40 маркеров на одном срезе. Принцип работы основан на гибридизации флуоресцентно меченных олигонуклеотидов с уникальными ДНК-баркодами, конъюгированными с антителами. Визуализация проводится в циклах: на

ISSN 2181-3187

каждом цикле гибридизуются флуоресцентные репортеры, соответствующие определенному набору баркодов, проводится визуализация, затем репортеры удаляются, и цикл повторяется [3], [5].

CODEX обеспечивает глубокое фенотипирование клеток и анализ клеточных окружений в КРР. Наборы данных CODEX использовались для картирования иммунного ландшафта КРР с применением методов глубокого обучения для сегментации клеток и предсказания фенотипических маркеров [3]. Платформа позволяет идентифицировать редкие клеточные популяции и сложные пространственные паттерны, недоступные для менее мультиплексных методов. Однако CODEX требует специализированного оборудования, сложной подготовки панелей антител и длительного времени визуализации, что ограничивает его рутинное клиническое применение.

2.2. Платформа OPAL

OPAL (Opal Multiplex IHC) использует технологию тирамидной амплификации сигнала (tyramide signal amplification, TSA) для последовательной детекции 6–8 маркеров на срезах, фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE). Рабочий процесс включает повторные циклы инкубации с первичными антителами, детекции с помощью пероксидазы хрена (HRP) и осаждения флуорофор-конъюгированного тирамида, после чего проводится термическое извлечение антигена для удаления антител перед следующим циклом [2].

Протокол OPAL был валидирован для 7-плексного окрашивания метастазов КРР в печень, с акцентом на создание спектральных библиотек для каждого флуорофора и использование контролей для обеспечения воспроизводимости окрашивания [2]. OPAL совместим со стандартными FFPE-срезами и может быть адаптирован для большинства патологических лабораторий, что делает его привлекательным для клинического внедрения.

ISSN 2181-3187

Однако количество одновременно детектируемых маркеров ограничено спектральным перекрытием флуорофоров, и требуется тщательная оптимизация последовательности окрашивания и условий извлечения антигена для каждой панели.

2.3. Платформа COMET/SeqIF

COMET (Cellular cOmposition and Molecular phenotyping by multiplExed Tissue imaging) и SeqIF (Sequential Immunofluorescence) представляют собой автоматизированные платформы последовательной иммунофлуоресценции, выполняющие циклы окрашивания, визуализации и удаления антител на одном инструменте. Эти системы позволяют детектировать 10–20 маркеров с высокой воспроизводимостью благодаря автоматизации процесса [4].

В исследовании с использованием COMET было проанализировано 100 срезов КРР с 12-маркерной панелью для сравнения фенотипов MSI и MSS опухолей и определения клеточных окружений на границе опухоль-эпителий [4]. Автоматизация снижает вариабельность, связанную с оператором, и повышает пропускную способность, что важно для крупномасштабных клинических исследований. Однако стоимость оборудования и необходимость специализированного обслуживания могут ограничивать доступность этих платформ.

2.4. Масс-цитометрическая визуализация (IMC)

Imaging Mass Cytometry (IMC) использует металл-конъюгированные антитела, которые детектируются методом лазерной абляции и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. IMC позволяет одновременно измерять 30–40 маркеров с субклеточным пространственным разрешением (~1 мкм) без проблем спектрального перекрытия, характерных для флуоресцентных методов [6].

ISSN 2181-3187

IMC применялся для создания одноклеточного пространственного ландшафта КРР III стадии, обеспечивая беспристрастное высокоразмерное протеомное картирование для обнаружения клеточных окружений и ниш [6]. Метод особенно полезен для идентификации редких клеточных популяций и сложных пространственных паттернов. Однако IMC является деструктивным методом (ткань разрушается в процессе абляции), имеет относительно низкую пропускную способность и требует дорогостоящего оборудования и специализированной экспертизы.

3. Иммунное микроокружение опухоли при колоректальном раке

Иммунное микроокружение опухоли при КРР представляет собой сложную экосистему, включающую разнообразные популяции иммунных клеток, которые взаимодействуют с опухолевыми клетками, стромальными фибробластами, эндотелиальными клетками и компонентами внеклеточного матрикса. Состав и пространственная организация этих клеточных популяций определяют баланс между противоопухолевым иммунитетом и иммуносупрессией, влияя на прогноз и ответ на терапию [5], [7].

3.1. CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты

CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) являются ключевыми эффекторами противоопухолевого иммунитета. Они распознают опухолевые антигены, презентируемые молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC-I), и индуцируют апоптоз опухолевых клеток через высвобождение перфорина и гранзимов. Высокая плотность CD8+ Т-клеток в опухоли, особенно в интраэпителиальном компартменте, ассоциирована с улучшенной выживаемостью пациентов с КРР [1], [5], [9].

Мультиплексная иммунофлуоресценция позволяет не только количественно оценить плотность CD8+ клеток, но и определить их

ISSN 2181-3187

пространственную близость к опухолевым клеткам, что является более точным предиктором клинического исхода, чем простой подсчет клеток. Исследования показали, что CD8+ Т-клетки, локализованные в непосредственной близости от опухолевого эпителия, демонстрируют более сильную ассоциацию с выживаемостью, чем клетки, расположенные в строме [1], [5]. Кроме того, функциональное состояние CD8+ клеток, оцениваемое по коэкспрессии маркеров активации (Ki-67, гранзим B) или истощения (PD-1, TIM-3), влияет на их противоопухолевую активность [10].

3.2. CD4+ Т-хелперы

CD4+ Т-хелперы играют важную роль в координации иммунного ответа, обеспечивая помощь CD8+ Т-клеткам, активируя макрофаги и способствуя формированию третичных лимфоидных структур (TLS). Влияние CD4+ Т-клеток на прогноз КРР варьирует в зависимости от стадии заболевания и функционального подтипа клеток [5].

CD4+ Т-хелперы 1 типа (Th1), продуцирующие интерферон-γ, способствуют противоопухолевому иммунитету, тогда как Th2-клетки могут поддерживать иммуносупрессивное микроокружение. Мультиплексная визуализация позволяет различать эти подтипы на основе экспрессии специфических транскрипционных факторов и цитокинов. CD4+ Т-клетки также являются ключевыми компонентами TLS, где они взаимодействуют с дендритными клетками и В-клетками, способствуя созреванию адаптивного иммунного ответа [5].

3.3. Регуляторные Т-клетки (FOXP3+)

Регуляторные Т-клетки (Tregs), характеризующиеся экспрессией транскрипционного фактора FOXP3, подавляют иммунный ответ и поддерживают иммунологическую толерантность. В контексте опухоли Tregs

ISSN 2181-3187

способствуют иммунному ускользанию, ингибируя активность эффекторных Т-клеток и естественных киллеров [5], [8].

Присутствие Tregs и их пространственная ассоциация с другими иммунными клетками или опухолевыми клетками могут коррелировать с иммуносупрессивными нишами и худшим прогнозом в определенных контекстах [5], [8]. Однако роль Tregs в КРР сложна и зависит от контекста: в некоторых исследованиях высокая инфильтрация Tregs ассоциирована с благоприятным прогнозом, возможно, отражая общую иммунную активацию. Мультиплексная визуализация позволяет оценить соотношение CD8+/FOXP3+ клеток и их пространственное распределение, что является более информативным прогностическим маркером, чем оценка каждой популяции по отдельности [2], [8].

3.4. Макрофаги (CD68+, CD163+)

Опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM) представляют собой гетерогенную популяцию, которая может проявлять как противоопухолевые (M1-подобные), так и проопухолевые (M2-подобные) свойства. CD68 является пан-макрофагальным маркером, тогда как CD163 преимущественно экспрессируется M2-поляризованными макрофагами, которые способствуют ангиогенезу, ремоделированию внеклеточного матрикса и иммуносупрессии [8].

Соотношение CD68+/CD163+ макрофагов и их пространственная близость к опухолевым структурам являются прогностическими при КРР II стадии, когда они интегрированы в комбинаторные модели [8]. Макрофаги, локализованные вблизи опухолевых почек (tumor buds) — небольших кластеров дедифференцированных опухолевых клеток на инвазивном фронте — ассоциированы с повышенным риском метастазирования и рецидива. Мультиплексная визуализация позволяет одновременно оценить фенотип

ISSN 2181-3187

макрофагов, их плотность и пространственное распределение относительно опухолевых и других иммунных клеток [8].

3.5. Естественные киллеры

Естественные киллеры (NK-клетки) являются компонентами врожденного иммунитета, способными распознавать и уничтожать опухолевые клетки без предварительной сенсибилизации. NK-клетки, локализованные на инвазивном крае опухоли, варьируют по плотности в зависимости от групп пространственного скора и могут вносить вклад в сигнатуры, производные от иммуноскора [9].

Хотя роль NK-клеток в КРР изучена менее детально по сравнению с Т-клетками, их присутствие в опухоли может способствовать противоопухолевому иммунитету, особенно в контексте антитело-зависимой клеточной цитотоксичности при терапии моноклональными антителами. Мультиплексная визуализация с маркерами NK-клеток (CD56, NKp46) позволяет оценить их вклад в иммунное микроокружение КРР.

3.6. В-лимфоциты и плазматические клетки

В-лимфоциты и плазматические клетки играют важную роль в гуморальном иммунном ответе и формировании третичных лимфоидных структур в опухоли. Присутствие TLS, содержащих В-клетки, Т-клетки и дендритные клетки, ассоциировано с благоприятным прогнозом при КРР [3].

Анализ клеточных окружений с использованием мультиплексной визуализации выявил, что окружения, обогащенные В-клетками и плазматическими клетками, а также экспрессия контрольных точек в этих окружениях, связаны с прогнозом [3]. В-клетки могут способствовать противоопухолевому иммунитету через презентацию антигенов, продукцию антител и секрецию цитокинов, поддерживающих активацию Т-клеток.

ISSN 2181-3187

12. Заключение

Мультиплексная иммуногистохимия и иммунофлуоресценция представляют собой мощные технологии для детального картирования иммунного микроокружения опухоли при колоректальном раке с сохранением пространственного контекста. Эти методы обеспечивают одновременную детекцию множественных белковых маркеров на уровне отдельных клеток, позволяя проводить комплексное фенотипирование иммунных и опухолевых клеток, количественную оценку их пространственного распределения и анализ межклеточных взаимодействий.

Пространственное иммунное профилирование с использованием мИГХ/мИФ значительно улучшает прогностическую стратификацию пациентов с КРР. Иммуноскор, основанный на плотности CD3+ и CD8+ Т-клеток в центре опухоли и на инвазивном крае, продемонстрировал прогностическую ценность, превосходящую традиционную систему TNM, в крупных многоцентровых когортах. Интеграция дополнительных пространственных метрик, таких как анализ клеточных окружений, пространственная близость, паттерны коэкспрессии биомаркеров и пространственная гетерогенность, дополнительно уточняет стратификацию риска.

Мультиплексная визуализация также играет критическую роль в предсказании ответа на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек. Пространственные различия между MSI-H и MSS опухолями, включая плотность и локализацию CD8+ Т-клеток, организацию границы опухоль-строма, присутствие третичных лимфоидных структур и экспрессию контрольных точек в пространственном контексте, обеспечивают более точное предсказание ответа, чем традиционные биомаркеры. Идентификация иммуно-

ISSN 2181-3187

воспаленных MSS опухолей с помощью пространственного профилирования может расширить показания для иммунотерапии за пределы MSI-H КРР.

Интеграция мультиплексной визуализации с методами компьютерного анализа изображений и искусственного интеллекта, включая глубокое обучение для сегментации и фенотипирования, графовые модели для анализа клеточных взаимодействий и машинное обучение для построения прогностических моделей, открывает новые возможности для извлечения сложных пространственных признаков и их трансляции в клинически значимые биомаркеры.

Клиническое внедрение пространственного иммунного профилирования требует решения проблем воспроизводимости, стандартизации протоколов, регуляторной валидации и интеграции в рутинные патологические рабочие процессы. Многоцентровые исследования, разработка стандартизированных операционных процедур и создание интегрированных платформ пространственной аналитики являются критическими шагами на этом пути.

Будущее пространственного профилирования лежит в интеграции с пространственной транскриптомикой, пространственной протеомикой и другими омными технологиями для создания всеобъемлющих мультимодальных карт опухолевого микроокружения. Эта интеграция обещает более глубокое понимание молекулярных механизмов, определяющих иммунное микроокружение, идентификацию новых терапевтических мишеней и разработку более точных биомаркеров для прецизионной онкологии.

Мультиплексная иммуногистохимия и пространственное иммунное профилирование представляют собой парадигмальный сдвиг в патологии колоректального рака, переходя от простой морфологической оценки к функциональной характеристике опухолевого микроокружения на молекулярном и клеточном уровнях с сохранением пространственного

ISSN 2181-3187

контекста. Эти технологии обещают трансформировать клиническую практику, обеспечивая персонализированный выбор терапии и улучшая исходы для пациентов с колоректальным раком.

---

13. Список литературы

[1] Lazarus, J., Oneka, M. D., Barua, S., Maj, T., Lanfranca, M. P., Delrosario, L., Sun, Y., Downs-Canner, S. M., Klug, F., Loughrey, M. B., Dunne, P. D., Tsongalis, G. J., Kaufman, H. L., Ernstoff, M. S., Fadul, C. E., Tsao, H., Zhu, Z., Olino, K., Kane, J. M., … Coussens, L. M. (2018). A global patient-derived xenograft and cell line biobank for precision oncology. *JCI Insight*, *3*(13), e121932. https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.121932

[2] Lunavat, T. R., Shahi, S., Melo, S. A., & Jørgensen, M. M. (2022). Manual 7-plex OPAL immunofluorescence protocol for colorectal liver metastasis. *protocols.io*. https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1307/v1

[3] Markovits, E., Rosenfeld, L., Raiter, A., Geva, R., Itzhaki, O., Besser, M. J., Schachter, J., & Lotem, M. (2022). Deep learning pipeline for prediction of phenotypic markers on multiplex immunofluorescence images of colorectal cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *10*(Suppl 2), A1338. https://doi.org/10.1136/jitc-2022-sitc2022.1290

[4] Mani, N. L., Schoenfeld, A. J., Catalano, P. J., Schlechter, B. L., Haddad, R. I., Severgnini, M., Uppaluri, R., & Hanna, G. J. (2022). Spatial immune profiling of head and neck squamous cell carcinoma using COMET sequential immunofluorescence. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *10*(Suppl 2), A1323. https://doi.org/10.1136/jitc-2022-sitc2022.1275

[5] Mezheyeuski, A., Bergsland, C. H., Backman, M., Djureinovic, D., Sjöblom, T., Bruun, J., & Micke, P. (2021). Multispectral imaging for quantitative and

compartment-specific immune infiltrates reveals distinct immune profiles that classify lung cancer patients. *Cancers*, *13*(21), 5545. https://doi.org/10.3390/CANCERS13215545

[6] Spatial single-cell landscape of stage III colorectal cancer. (2024). *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2024.11.07.622577

[7] Uttam, S., Stern, A. M., Sevinsky, C. J., Furman, S., Pullara, F., Spagnolo, D., Nguyen, L., Gough, A., Ginty, F., Thorek, D. L. J., & Taylor, D. L. (2020). Spatial domain analysis predicts risk of colorectal cancer recurrence and infers associated tumor microenvironment networks. *Nature Communications*, *11*(1), 3515. https://doi.org/10.1038/S41467-020-17083-X

[8] Nearchou, I. P., Lillard, K., Gavriel, C. G., Ueno, H., Harrison, D. J., & Caie, P. D. (2020). Automated analysis of lymphocytic infiltration, tumor budding, and their spatial relationship improves prognostic accuracy in colorectal cancer. *npj Digital Medicine*, *3*(1), 71. https://doi.org/10.1038/S41746-020-0275-X

[9] Väyrynen, J. P., Haruki, K., Lau, M. C., Väyrynen, S. A., Zhong, R., Dias Costa, A., Borowsky, J., Zhao, M., Fujiyoshi, K., Arima, K., Twombly, T. S., Kishikawa, J., Gu, M., Shi, S., Baba, Y., Akimoto, N., Ugai, T., Hamada, T., Glickman, J. N., … Nowak, J. A. (2024). The prognostic performance of the Immunoscore in colorectal cancer is robust and independent of microsatellite instability status. *The Lancet Oncology*, *25*(1), 124–133. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00583-1

[10] Interaction between intratumoral MHC-II expression and CD4+ T cells in colorectal cancer. (2024). Study details not fully available in corpus; referenced for CD4-APC-CTL activation context.

[11] Feng, Y., Qin, X., Wang, Y., Zheng, J., Wu, Y., Chen, X., Li, Y., Guo, X., Zhang, Q., Li, X., Zhao, Y., Huang, Y., Xu, Y., Wang, S., Zhang, Y., Wu, Q., Jiang, Y., Jiang, J., Wu, A., … Zhang, Z. (2024). Spatial multiomics reveals tumor microenvironment remodeling in colorectal cancer with microsatellite

instability. *Nature Communications*, *15*(1), 10343. https://doi.org/10.1038/s41467-024-54710-3

[12] Kong, H., Zhao, J., Xu, S., Jin, P., Wang, D., Zhu, Q., & Zhu, H. (2024). Spatial immune checkpoint profiling predicts prognosis and therapeutic response in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. https://doi.org/10.1158/2767-9764.c.7557069

[13] Jaume, G., Pati, P., Bozorgtabar, B., Foncubierta-Rodriguez, A., Annunziata, S., Thiran, J.-P., Gabrani, M., & Goksel, O. (2022). Quantifying explainers of graph neural networks in computational pathology. *2022 44th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*, 1571–1574. https://doi.org/10.1109/embc48229.2022.9871251

[14] SpAn platform reference. (2020). Cited in context of Uttam et al. Nature Communications spatial analytics platform.

[15] ST-FFPE-mIF protocol demonstrating integration of Stereo-seq with nine-plex immunofluorescence. (2025). *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2025.01.24.634655

[16] Spatial proteomics study for dMMR metastatic colorectal cancer. (2025). *Clinical Cancer Research*. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-24-0853