

## РОЛЬ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ИССЛЕДОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МОРФОЛОГИИ ТКАНЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ: МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И АНАЛИЗ ДАННЫХ

**Атиакшин Д.А., Костин А.А., Демяшкин Г.А., Алекснович А.А., Саридис М.Р.,  
Приходько А.Т.**

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Научно-образовательный ресурсный центр «Инновационные технологии иммунотипирования, цифрового пространственного профилирования и ultraструктурного анализа», Москва, Россия

### Аннотация

Изучение тканевого микроокружения (ТМО) представляет собой важную и актуальную задачу для развития персонализированных подходов в практической медицине, а также для фундаментального понимания механизмов развития патологических процессов. Качественный анализ ТМО требует применения технологий, реализующих одновременную детекцию множества молекулярных маркеров на срезе с сохранением пространственного контекста. Современные методы пространственного профилирования включают подходы на основе макро- и микродиссекций для секвенирования, технологии пространственного баркодирования, оптическую визуализацию и масс-спектрометрию. Каждое из перечисленных направлений обладает уникальными особенностями с точки зрения оптического разрешения, мультиплексности и мишней для проводимого анализа, что позволяет исследовать функциональную архитектуру ТМО на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях *in situ*, включая транскриптомные и протеомные характеристики. Мультиплексная иммунофлуоресценция (мИФ) – один из методов оптической визуализации, обладающий рядом преимуществ, а именно высокой чувствительностью, сохранением структурно-биологических параметров тканевой организации и возможностью точного фенотипирования клеток в контексте их пространственного расположения (гистоархитектоники). В данном обзоре рассматриваются ключевые принципы и области применения современных методов пространственного анализа в исследовании функциональной морфологии тканевого микроокружения, а также подробно обсуждаются преимущества, ограничения и аналитические подходы для обработки данных мИФ. Особое внимание уделено методам сегментации, клеточного фенотипирования и пространственной статистики (Ripley's K, анализ ближайших соседей, графовые модели). Разбираются современные вычислительные инструменты и тенденции в применении искусственного интеллекта для анализа пространственных биомедицинских данных. Совокупность данных подходов открывает перспективные возможности для системной многопараметрической характеристики ТМО с открытием неизвестных фундаментальных закономерностей организации живой материи на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях, являющихся базисом для разработки трансляционных маркеров нового поколения, повышения информативности диагностических и прогностических алгоритмов, а также эффективности терапевтических мероприятий в персонализированной медицине.

### Ключевые слова:

тканевое микроокружение, омиксные технологии, многомерная морфология, мультиплексная иммунофлуоресценция, пространственное фенотипирование, профилирование и картирование, пространственная протеомика, анализ иммунофлуоресцентных изображений, искусственный интеллект.

## THE ROLE OF SPATIAL TECHNOLOGIES IN THE STUDY OF THE TISSUE MICROENVIRONMENT FUNCTIONAL MORPHOLOGY: IMAGING METHODS AND DATA ANALYSIS

**Atiakshin D.A., Kostin A.A., Demyashkin G.A., Alekhnovich A.V., Saridis M.R.,  
Prikhodko A.T.**

Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Research and Educational Resource Center «Innovative technologies of immunophenotyping, digital spatial profiling and ultrastructural analysis», Moscow, Russia

### Abstract

The tissue microenvironment (TME) research is an important and relevant task for the development of personalized approaches in practical medicine, as well as for a fundamental understanding of the mechanisms of pathological processes. An accurate TME analysis requires the implementation of technologies that enable the simultaneous detection of multiple molecular markers on a section while preserving the spatial context. Modern spatial profiling methods include approaches based on macro- and microdissections for sequencing, spatial barcoding technologies, optical imaging, and mass spectrometry. Each of these approaches has unique features in terms

of optical resolution, multiplexing, and targets for analysis, allowing the functional architecture of the TME to be studied at the tissue, cellular, and molecular levels *in situ*, including transcriptomic and proteomic characteristics. Multiplex immunofluorescence (mIF) is one of the optical imaging methods which has a number of advantages, namely high sensitivity, preservation of the structural and biological parameters of tissue organization, and the ability to accurately phenotype cells in the context of their spatial location (histarchitectonics).

This review examines the key principles and areas of application of modern spatial analysis methods in the study of the TME functional morphology, and discusses in detail the advantages, limitations, and analytical approaches for processing mIF data. Particular attention is brought to segmentation methods, cell phenotyping, and spatial statistics (Ripley's K, nearest neighbor analysis, graph models). Modern computational tools and trends in the application of artificial intelligence for the analysis of spatial biomedical data are considered. The combination of these approaches opens up promising opportunities for the systematic multiparametric characterization of TME with the discovery of unknown fundamental patterns of living matter organization at the tissue, cellular, and molecular levels, which are the basis for the development of a new generation of translational markers, improving the informativeness of diagnostic and prognostic algorithms, as well as the effectiveness of therapeutic measures in personalized medicine.

**Keywords:**

tissue microenvironment, omics technologies, multidimensional morphology, multiplex immunofluorescence, spatial phenotyping, profiling and mapping, spatial proteomics, immunofluorescence image analysis, artificial intelligence.

## Введение

Тканевое микроокружение (ТМО) представляет собой динамичную, пространственно организованную систему, включающую клетки различных типов, внеклеточный матрикс и сигнальные молекулы. Пространственная организация ТМО определяет многие физиологические и патологические процессы, включая канцерогенез, воспаление и регенерацию тканей [15, 19]. Клиническая значимость ландшафта ТМО особенно возрастает в области иммуноонкологии: расположение иммунных клеток относительно опухоли, плотность различных субпопуляций и их взаимное влияние могут определять ответ на терапию, прогноз и выживаемость пациента.

Традиционные методы гистохимической и иммуногистохимической (ИГХ) визуализации широко используются для морфологической оценки и выявления отдельных маркеров, но все же обладают ограничениями, связанными со сложностью реализации высокоплексных протоколов окрашивания и их дальнейшей интерпретацией. Моноплексный характер проводимых и хорошо зарекомендовавших себя гистохимических и иммуногистохимических протоколов в практике традиционного морфологического анализа не позволяет учитывать в рамках одного микропрепарата сложный характер имеющихся взаимосвязей как клеточных популяций, так и структур внеклеточного матрикса друг с другом.

Применение методов многомерной морфологии для исследования клеточного (иммунного, не иммунного, стромального) ландшафта и внеклеточного матрикса с использованием биоинформационного анализа и технологий искусственного интеллекта, открывает уникальные возможности

для расширения окна интерпретации полученных результатов исследования, с учетом раскрытия характера взаимодействия структурных компонентов многопараметрической системы тканевого микроокружения.

Использование мультиплексных гистохимических и иммуногистохимических технологий искусственного интеллекта при биоинформационном анализе больших данных результатах одновременной детекции множества (до 10 и более) молекулярных, клеточных и тканевых мишеней на гистологическом образце обладает существенными информационными преимуществами для оценки функциональной морфологии тканевого микроокружения по сравнению с классическими моноплексными подходами. Технологии одновременной детекции множества молекулярных мишеней в пределах одного и того же гистологического среза, с последующими этапами пространственного фенотипирования и цифрового профилирования создают условия для регистрации уникальных характеристик иммунного и стромального ландшафтов, открытия механизмов ремоделирования внеклеточного матрикса и роли межклеточных коопераций при реализации морфогенеза как в норме, так и при патологии.

В настоящее время можно выделить четыре основных класса методов исследования ТМО (рис. 1):

1. Методы на основе диссекции (например, лазерная микродиссекция – [10, 14]), позволяющие изолировать отдельные регионы ткани для дальнейшего секвенирования.
2. Технологии пространственного баркодирования, которые обеспечивают реализацию пространственного транскриптомного анализа [42, 45].

3. Методы визуализации, охватывающие спектр подходов от t-CyCIF (tissue-based cyclic immunofluorescence; тканевая циклическая иммунофлуоресценция) [25] до гиперплексной иммунофлуоресценции [18], сохраняют гистотопографический контекст даже при высокой мультиплексности.
4. Масс-спектрометрические методы визуализации, такие как масс-цитометрическая визуализация [16] и MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization; матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) [44], объединяющие молекулярную точность масс-спектрометрии с пространственным разрешением молекулярных, клеточных и тканевых мишеней.

Мультиплексная иммунофлуоресценция (mIF) занимает особое место как технология, обеспечивающая оптимальный баланс между чувствительностью, пространственным разрешением и совместимостью с клиническими образцами [40, 49]. Современные системы автоматизированного окрашивания и спектрального разделения каналов позволяют одновременно детектировать десятки белковых маркеров в одном срезе ткани [20, 50].

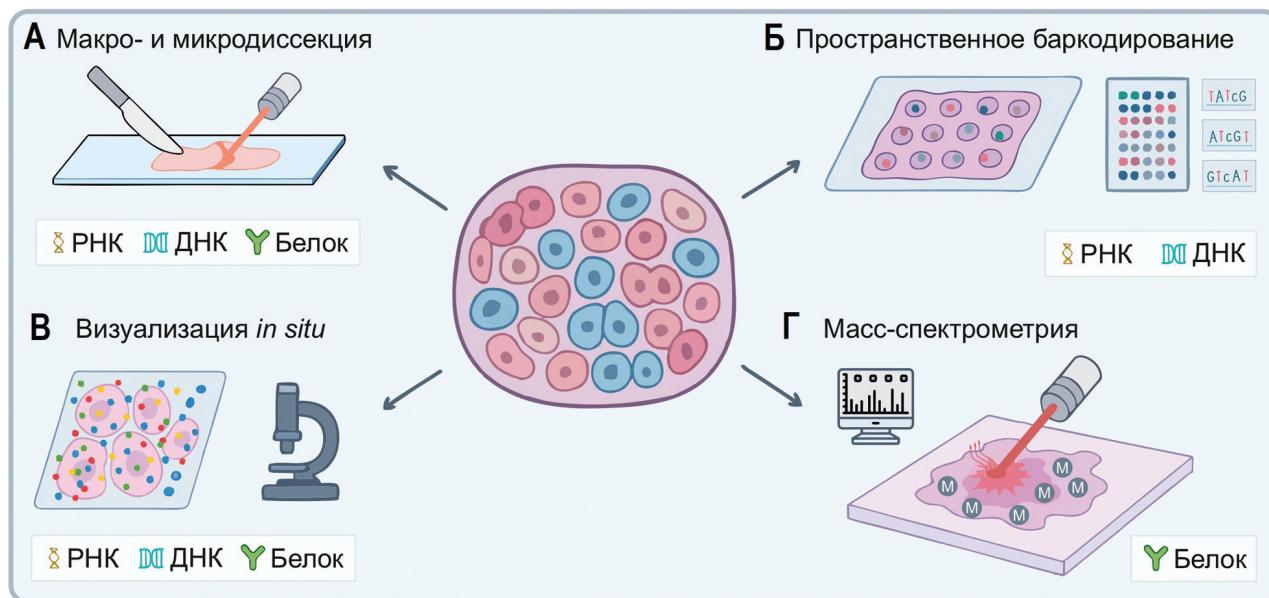
Дальнейшее развитие этих методов, наряду с применением вычислительных подходов искусственного интеллекта для анализа изображений, формирует новую парадигму пространственной

биологии, где ткань рассматривается как самоорганизованная экосистема, а патогенез – как нарушение её пространственной архитектуры.

### Классификация методов исследования тканевого микроокружения

#### Методы на основе диссекции

Исторически первыми подходами для молекулярного анализа тканей стали методы, основанные на физическом выделении интересующих областей. Они обеспечивают исчерпывающую молекулярную характеристику, однако приводят к усреднению данных по всем выделенным популяциям клеток, что является их основным ограничением. К таким методам относится макродиссекция и мультирегиональное секвенирование, которое включает забор нескольких биопсийных образцов из разных участков ткани (рисунок 1А). Последующий омиксный анализ, например, экзомное секвенирование, предоставляет усредненную молекулярную картину для каждого региона. Это позволяет оценить межрегиональную гетерогенность и выявить разветвленную эволюционную структуру ткани, в частности, опухолевой ткани, при которой большинство соматических мутаций (63-69%) могут не обнаруживаться в каждом отдельном образце [15]. Было показано, что профили экспрессии генов, связанные с благоприятным или неблагоприятным прогнозом, могут одновременно присутствовать в разных регионах одной и той же опухоли [15]. Более преци-



**Рис. 1.** Методы исследования тканевого микроокружения с учетом пространственных характеристик изучаемых объектов.  
 А – методы макро- и микродиссекции для секвенирования.  
 Б – пространственная транскриптомика на основе баркодирования подложки  
 В – оптические методы визуализации молекул (РНК, белков).  
 Г – масс-спектрометрия

зионной технологией является микродиссекция с лазерным захватом (ЛЗМ), позволяющая точно выделить интересующие участки ткани, клеточные кластеры или даже отдельные клетки [10]. Полученный материал используется для высоко-производительного геномного, транскриптомного или протеомного анализа [10, 14]. Таким образом, ЛЗМ решает проблему клеточной гетерогенности образца, хотя и сопряжен с риском деградации РНК в процессе выделения, особенно в тканях с высокой активностью эндогенных рибонуклеаз [4].

### **Пространственная транскриптомика**

Технология пространственного баркодирования чипов привнесла существенный вклад в транскриптомику, позволив связать экспрессию генов с ее фактической локализацией на срезе (рисунок 1Б). Существует ряд коммерчески реализованных решений: Visium, Slide-seq, Stereo-seq, в основе которых используют подложки с участками фиксированного диаметра. Нанесенные праймеры, комплементарные поли-А хвосту мРНК, также содержат уникальные молекулярные метки, называемые баркодами. Именно баркоды осуществляют связь экспрессии с ее пространственной локализацией [42]. Срез ткани (данные технологии в подавляющем большинстве экспериментов требуют криосрезы) помещается на чип, клеточные мембранные пермеабилизируются, и мРНК гибридизуются с баркодированными зондами. Последующее секвенирование позволяет картировать экспрессию генов обратно на гистологическое изображение среза [42]. Технология обеспечивает анализ всего транскриптома, однако разрешение ограничено размером локальной области анализа (около 55 мкм для Visium), что не позволяет достичь разрешения уровня отдельных клеток [31, 42]. Последующие усовершенствования значительно повысили разрешение и чувствительность захвата мРНК, приблизив ее к эффективности методов одноклеточного секвенирования РНК [46].

### **Методы на основе оптической визуализации**

Обширная категория методов на основе оптической визуализации объединяет подходы, в которых отдельные молекулы (РНК или протеины) визуализируются непосредственно в срезе ткани с помощью микроскопии (рисунок 1В). Эти методы обеспечивают высокое, вплоть до субклеточного, разрешение, но, в отличие от методов баркодирования, как правило, являются таргетными, то есть требуют предварительного выбора целевых молекул интереса для проводимого анализа. Мультиплексная иммунофлуоресценция (мИФ) позво-

ляет одновременно визуализировать десятки белков в одном образце. Это достигается с помощью циклических подходов, таких как t-CyCIF, где многократно повторяются циклы окрашивания антителами, визуализации и последующего химического обесцвечивания флуорофоров, что позволяет создавать 60-плексные изображения на рутинных парафиновых срезах [25]. Другой метод, активно применяющийся в иммунофлуоресцентных протоколах – тирамидная амплификация сигнала (ТАС), использует реакцию, катализируемую пероксидазой хрена (HRP), для ковалентного осаждения флуорофоров вблизи целевого белка, что значительно усиливает сигнал [52]. Для визуализации РНК используется флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) и ее высокомультиплексные варианты, такие как MERFISH (Multiplexed Errgor-Robust Fluorescence *in situ* Hybridization; мультиплексная флуоресцентная гибридизация *in situ* с высокой устойчивостью к ошибкам) и seqFISH (sequential Fluorescence *In Situ* Hybridization; последовательная флуоресцентная гибридизация *in situ*), позволяющие одновременно детектировать и картировать сотни и даже тысячи различных молекул РНК в отдельных клетках с субклеточным разрешением [6, 13]. Интегрированные платформы, такие как GeoMx Digital Spatial Profiler, комбинируют визуализацию с высокомультиплексным анализом. Исследователь на основе иммунофлуоресцентного изображения выбирает области интереса (regions of interest, ROI), которые затем освещаются УФ-светом для высвобождения баркодирующих олигонуклеотидов с РНК или белковых зондов для последующего цифрового подсчета и анализа [30].

### **Масс-спектрометрические методы визуализации**

Передовые масс-спектрометрические методы визуализации сочетают специфичность антител с чувствительностью и мультиплексностью масс-спектрометрии. В этих технологиях в качестве меток используются не флуорофоры, а стабильные изотопы тяжелых металлов, что исключает проблему спектрального перекрытия сигналов и автофлуоресценции ткани. Примером является масс-цитометрия (Imaging Mass Cytometry, IMC), где срез ткани окрашивается набором из десятков антител, конъюгированных с уникальными изотопами металлов. Затем лазерный пучок сканирует образец с разрешением около 1 мкм, приводя к лазерной абляции материала. Образующееся облако ионов анализируется TOF-масс-спектрометром, что позволяет одновременно создавать изображения распределения 40 и

Таблица 1

Сравнение современных методов пространственного анализа тканевого микроокружения

Класс метода	Принцип	Тип данных	Совместимость с FFPE	Основные применения	Преимущества	Ограничения	Ссылки
1. Методы на основе физической диссекции	Лазерная или механическая изоляция регионов интереса с последующим секвенированием.	Транскриптамика, протеомика, геномика, геномика размера ROI)	10–100 мкм (в зависимости от размера ROI)	Сотни–тысячи мкм (в зависимости от размера ROI)	Исследование гетерогенных опухолей, локальных участков воспалительных изменений, анализ бляшек при болезни Альцгеймера и др.	Высокая точность выбора области, возможность обнаружения низкотономного анализа	Потеря контекста солекализации седных клеток, [14], [22]
2. Технологии пространственно привязанных транскриптогомики	Пространственно привязанные баркоды на поверхности чипа	Транскриптамика (иногда протеомика)	0.5–55 мкм (Visium – 55 мкм, HDST – 2 мкм, Stereo-seq – 0.5 мкм)	До десятков тысяч транскриптов	Карты экспрессии генов в областях интереса мозга и других органов, опухолей, в биологии развития и др.	Высокая масштабируемость, возможность обработки данных	Ограничиченная информация о протеоме, [8], [35], [45], [53]
3. Методы на основе оптической визуализации	Последовательное или параллельное визуальное выявление белков или РНК в ткани	Протеомика, транскриптамика	0.2–1 мкм (субклеточное разрешение)	10–60+ белков (в зависимости от метода), до 10 000 транскриптов	Пространственная организация клеток, иммунный ландшафт, морфология тканевых ниш	Высокое разрешение, совмещение морфологии и молекулярных данных	Перекрёстная реактивность, антитела, антифлуоресценция, оптические ограничения
4. Масс-спектрометрические методы визуализации	Картирование белка, липиды, элементы, метаболиты	0.5–5 мкм	До 40–60 белков (IMC)	Да	Пространственная протеомика, химическая картография тканей, открытие биомаркеров	Высокая мультиплексность, отсутствие флуоресцентных ограничений	Высокая стабильность, сложность подготовки и анализа, низкая скорость сканирования

более маркеров с разрешением на уровне отдельных клеток [5, 16]. Схожий метод, мультиплексная ионно-лучевая визуализация (Multiplexed Ion Beam Imaging, MIBI), использует для ионизации первичный ионный пучок, что позволяет достигать еще более высокого пространственного разрешения, вплоть до субклеточного [1]. Новейший подход, DVP (Deep Visual Proteomics; глубокая визуальная протеомика), объединяет аналитику изображений, осуществляющую искусственным интеллектом, автоматизированную лазерную микродиссекцию и ультрачувствительную масс-спектрометрию для глубокого протеомного профилирования (тысячи белков) клеточных популяций, выбранных непосредственно в ткани [33]. Этот метод позволяет связать протеомные данные с комплексными клеточными фенотипами, сохраняя при этом пространственный контекст в архивных клинических образцах [33].

### **Сравнительная характеристика технологий пространственного анализа функциональной морфологии тканевого микроокружения**

Развитие выше приведенных взаимодополняющих технологий стирает границы между классической гистологией, патоморфологией, молекулярной биологией и биоинформатикой, открывая новое смежное направление в исследовании тканей с получением крупного массива дополнительных данных, обладающих прорывным характером по уровню достижаемой информативности. Сводка методов с их основными преимуществами и недостатками приведена в Таблице 1.

Из сопоставления видно, что методы оптической визуализации представляют собой «золотую середину» между информативностью получаемых данных и пространственным разрешением. Они позволяют получить субклеточное разрешение (до 0,2–1 мкм) и одновременно визуализировать исчерпывающее количество маркеров, сохраняя морфологический контекст и гистотопографические характеристики исследуемого объекта. Особенно выделяются методы, основанные на масс-цитометрии, поскольку они обеспечивают реализацию высокоплексных протоколов (30–40 и более одновременно детектируемых маркеров на срезе) без оптических ограничений. Однако данные методы требуют значительных финансовых и временных ресурсов, что на данный момент времени представляет внедрение в рутинную практику маловероятным. Методы диссекции, в свою очередь, предоставляют исчерпывающие данные об экспрессии генов, но теряют пространственный контекст; технологии пространственного баркодирования

(например, Stereo-seq) обеспечивают исчерпывающие данные об экспрессии генов с высоким разрешением и сохраняют пространственный контекст. Однако, как и в случае масс-цитометрии, данные методы являются дорогостоящими и трудоемкими как с точки зрения проведения протокола, так и с точки зрения анализа получаемого массива данных. Кроме того, технология Stereo-seq в первую очередь специализируется на работе с криосекциями. В следующем разделе подробно рассматривается метод мультиплексной иммуногистохимии / иммунофлуоресценции (мИГХ / мИФ), как один из наиболее распространенных и перспективных для внедрения в современную медицинскую практику подходов для анализа тканевого микроокружения.

### **Преимущества технологии мультиплексной иммунофлуоресценции в исследовании функциональной морфологии тканевого микроокружения**

#### **Преимущества по сравнению с методами на основе диссекции и традиционного моноплексного ИГХ окрашивания**

Традиционная иммуногистохимия является «золотым стандартом» в патологии, однако ограничена возможностью окрашивания одного-двух маркеров на срезе ткани [48]. Использование серийных срезов для моноплексного иммуногистохимического анализа приводит к быстрому расходованию ценного биологического материала в процессе реализации дизайна окрашивания и не создает условия для точного анализа солокализации и пространственных взаимодействий клеток и внеклеточных структур [48].

**Ключевое преимущество мИФ** – это получение мультиплексных данных при сохранении целостности архитектуры ткани. Валидационные исследования наглядно демонстрируют надежность этой технологии. Например, при анализе метастатической меланомы была показана высокая корреляция (коэффициент Спирмена  $> 0,9$ ) между плотностью клеток, позитивных по маркерам CD8, CD68, PD-L1 и SOX10, измеренной с помощью мИФ и стандартной ИГХ на серийных срезах [56]. Аналогичные результаты с высокой степенью корреляции ( $rs > 0,9$ ) были получены при сравнении методов на образцах колоректального рака [40]. Эти данные подтверждают, что мИФ не только воспроизводит результаты стандартных методов, но и значительно расширяет их, позволяя проводить точный количественный анализ множества клеточных популяций и их взаимодействий в одном образце, что невозможно при использовании серийных срезов.

Современные мИФ решения, использующие технологию усиления сигнала тирамидом и мультиспектральную визуализацию, обладают значительными преимуществами перед традиционной флуоресцентной микроскопией. ТАС обеспечивает высокую чувствительность и стабильность сигнала [7], а **мультиспектральная визуализация математически разделяет сигналы** от разных флуорофоров и эффективно устраниет аутофлуоресценцию ткани [26]. Это обеспечивает высокое соотношение сигнал/шум и надежность количественных данных. Клиническая значимость такого подхода была продемонстрирована в исследовании рака молочной железы, где удалось выявить, что у пациенток с люминальным раком молочной железы типа B, ответивших на неоадьювантную иммунотерапию, наблюдался более высокий уровень инфильтрации опухоли лимфоцитами, что позволило с высокой точностью предсказывать патологический ответ [12].

Преимущества перед технологиями пространственной транскриптомики

Технология пространственной транскриптомики является мощным инструментом для гиперплексного анализа, однако зачастую анализ экспрессии проводится в пределах заранее определенных областей интереса [48], что может не отражать всех важных особенностей микроокружения на срезе.

В это же время **мИФ обеспечивает разрешение на уровне отдельных клеток** по всему срезу ткани, что является фундаментальным требованием для точного фенотипирования и картирования клеток в их нативном окружении [26]. Именно такое разрешение позволило в оригинальном исследовании на когорте пациентов с меланомой, получавших анти-PD-1 терапию, выявить, что пространственная близость и плотность редких клеточных популяций, таких как CD8+FoxP3+PD-1<sup>low/mid</sup> Т-клетки, являются мощным предиктором ответа на лечение [3]. Идентификация подобных сложных и редких клеточных фенотипов, чья прогностическая значимость зависит от их точной локализации, была бы затруднительна при использовании методов, усредняющих сигнал по областям интереса.

Важно отметить и тот факт, что метод мИФ является более доступным с точки зрения бюджета лаборатории.

#### **Преимущества перед масс-спектрометрическими методами визуализации**

Масс-спектрометрические методы, такие как

масс-цитометрия, предлагают впечатляющие возможности по мультиплексированию (до 40 маркеров) и лишены проблем спектрального перекрытия [16, 51]. Исследования показывают сопоставимые результаты окрашивания и хорошую корреляцию между масс-цитометрией и количественной иммунофлуоресценцией при анализе таких маркеров, как HER2 и Ki-67 [51].

Тем не менее, в сравнении с масс-цитометрией, **мИФ обладает рядом важных преимуществ, таких как высокая скорость сканирования и пропускная способность** [48]. Сканирование области 1  $\text{мм}^2$  методом масс-цитометрии может занимать несколько часов, что делает анализ целых срезов ткани крайне время затратным [48]. Кроме того, масс-цитометрия обычно имеет более низкое пространственное разрешение (около 1  $\text{мкм}^2/\text{пиксель}$ ), что затрудняет точную клеточную сегментацию, особенно сегментацию иммунных клеток небольших размеров [28]. В то же время, автоматизированные мИФ-платформы позволяют быстро сканировать целые срезы с субмикронным разрешением, что критически важно для крупномасштабных трансляционных исследований и клинических испытаний [3, 18]. Наконец, масс-спектрометрические методы являются деструктивными (ткань разрушается в процессе абляции), что делает невозможным ее повторное использование для других анализов [48].

#### **Ограничения и недостатки мИФ**

Несмотря на свои многочисленные преимущества, мультиплексная иммунофлуоресценция обладает рядом ограничений и недостатков, которые необходимо учитывать при планировании исследований и интерпретации данных.

Одним из наиболее значительных препятствий является сложность разработки и валидации протокола окрашивания. Создание надежной мИФ-панели представляет собой трудоемкий и итеративный процесс, требующий временных и финансовых затрат [9]. Далеко не все антитела, хорошо зарекомендовавшие себя в стандартной иммуногистохимии, подходят для мультиплексного анализа, что требует проведения строгой валидации каждого реагента на специфичность и чувствительность в рамках всей панели для исключения перекрестной реактивности [23, 37]. Кроме того, в протоколах с использованием технологии усиления сигнала тирамидом порядок нанесения антител и флуорофоров может критически влиять на результат, поскольку некоторые антигены могут маскироваться или стерически блокироваться после нескольких циклов окрашивания.

Для достижения качественного результата окрашивания требуется тщательная оптимизация последовательности нанесения реагентов и антител [23]. Так, в исследовании MITRE было показано, что даже при использовании стандартизованных протоколов и оборудования наблюдается вариабельность в количественной оценке плотности клеток и экспрессии маркеров между разными лабораториями, особенно для низкоэкспрессированных белков, таких как PD-1 и PD-L1, требующих усиления сигнала [49].

Сложность анализа получаемых данных представляет собой еще одну актуальную задачу, требующую разработки новых автоматизированных подходов. Точная сегментация (определение границ) отдельных клеток и их последующее фенотипирование являются нетривиальными задачами, особенно в плотных клеточных кластерах, и ошибки на этом этапе могут приводить к неверной интерпретации клеточного состава [54]. Анализ таких данных сопряжен с необходимостью использования сложных статистических моделей, способных работать с большим количеством нулевых значений и учитывать пространственные взаимосвязи между клетками, для чего все чаще применяются передовые методы, включая графовые нейронные сети [54, 58].

Наконец, метод имеет ограничения по степени мультиплексирования. Большинство технологий на основе мИФ сталкиваются с компромиссом между количеством одновременно анализируемых маркеров, чувствительностью и скоростью сканирования [20]. Циклические методы, позволяющие достигать высокого уровня мультиплексности, часто требуют значительного времени на проведение последовательных циклов окрашивания и визуализации, что снижает их пропускную способность [9]. Традиционные протоколы мИФ остаются трудоемкими, что ограничивает их масштабируемость для анализа больших клинических когорт [32, 36]. Таким образом, успешное применение мИФ требует глубокой экспертизы на всех этапах, от разработки протокола до биоинформационного анализа, а присущие методу ограничения должны тщательно взвешиваться при планировании исследований.

Мультиплексная иммунофлуоресценция представляет собой сбалансированную и практически применимую платформу для глубокого изучения ТМО. Сохраняя пространственную архитектуру ткани и обеспечивая высокое разрешение, мИФ позволяет проводить детальное фенотипирование и количественный анализ, что подтверждается

как валидационными исследованиями в сравнении с ИГХ [56], так и оригинальными работами, демонстрирующими ее прогностическую ценность [3, 12]. По сравнению с другими методами, мИФ предлагает оптимальное сочетание мультиплексности, пропускной способности, разрешения и чувствительности, что делает ее ведущим инструментом для трансляционных исследований и разработки биомаркеров в клинической иммunoонкологии [18].

### Современные подходы в анализе данных мИФ

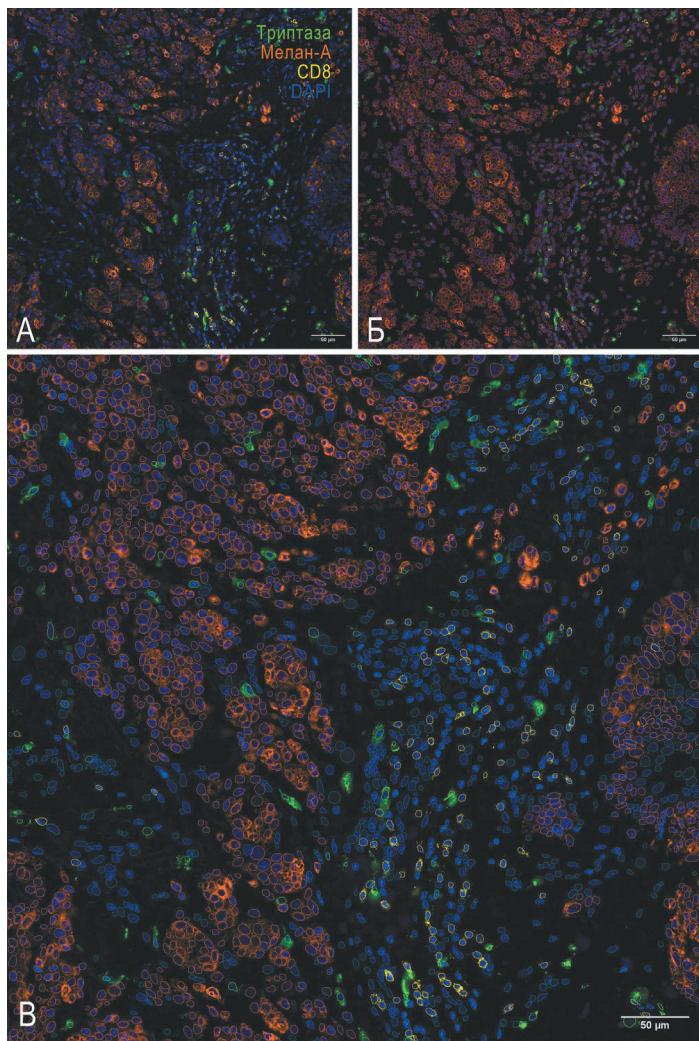
#### Сегментация и фенотипирование клеток

Анализ данных, полученных методом мультиплексной иммунофлуоресценции, сопряжен с серьезными вычислительными проблемами, ключевыми из которых являются сегментация и фенотипирование клеток (рисунок 2). Точность начальных этапов обработки изображений имеет первостепенное значение, поскольку ошибки, допущенные на этих стадиях, оказывают существенное влияние на все последующие вычислительные результаты [54].

Сегментация клеток реализует определение границ каждой отдельной клетки (рисунок 2Б) на изображении для создания цифровых «масок» с целью измерения интенсивности флуоресцентных сигналов, которые соответствуют различным белковым маркерам, экспрессируемым внутри клетки. Результатом этого этапа является таблица данных, где каждая строка представляет одну клетку, а столбцы содержат ее пространственные координаты (X, Y) и уровни экспрессии всех маркеров [38].

Задача сегментации чрезвычайно усложняется при плотной упаковке ядер (очаговая лимфоцитарная инфильтрация, опухолевые клетки) и в случае патологий, при которых клетки имеют неправильную форму, что приводит к перекрытиям и потере важных данных [39]. Большинство методов сегментации основаны на идентификации клеточных ядер, окрашенных с помощью ядерного красителя (в частности, DAPI) [39]. Обучение нейросетей на данных, учитывающих сложные для сегментации области, позволяет снизить процент ошибок, и является оптимальным решением для работы с нестандартными патологиями.

Существует проблема определения границ всей клетки с учетом ее цитоплазмы; реализованные на данный момент решения основаны либо на параметре, учитывающем расширение контура ядра, либо на использовании специфических мембранных или цитоплазматических маркеров,



**Рис. 2.** Сегментация и классификация ядер в зоне интереса на МИФ изображении.

А – Исходное изображение зоны интереса, меланома кожи стадии IIa.

Б – Результат сегментации, осуществленной в версии Qupath 0.5.1 с использованием стандартной флуоресцентной модели, обученной в расширении Stardist.

В - Пример классифицированных детекций. Фенотипирование проводилось в версии Qupath 0.5.1 с использованием встроенного точечного классификатора объектов. Голубой цвет – DAPI, зеленый цвет – трипаза, желтый цвет – CD8, оранжевый цвет – MelanA.

поскольку не существует универсального маркера, подходящего для всех типов клеток [39]. Любые неточности, допущенные на этапе сегментации ядер, неизбежно распространяются на все последующие этапы анализа, включая фенотипирование и пространственный анализ [43].

Важно отметить, что многие существующие алгоритмы не способны учитывать клеточную гетерогенность и пространственный контекст, например, тенденцию клеток одного типа к со-

вместному расположению [58]. Наконец, обработка изображений целых срезов, содержащих большое число клеток (порядок варьируется в зависимости от типа ткани и может достигать миллионов сегментированных объектов), представляет собой серьезную проблему масштабируемости для многих существующих инструментов [47, 58].

Для решения перечисленных проблем активно развиваются передовые вычислительные подходы, в первую очередь основанные на применении искусственного интеллекта. В области сегментации модели глубокого обучения, обученные на больших наборах данных, демонстрируют значительное превосходство над классическими алгоритмами, особенно в точной идентификации ядер [43]. Разрабатываются комплексные автоматизированные конвейеры, использующие нейронные сети для всех этапов анализа изображений, от обнаружения артефактов до сегментации тканей и отдельных клеток [47], [57]. Для фенотипирования предлагаются инновационные фреймворки на основе графовых нейронных сетей, которые представляют данные мИФ в виде многоуровневой сети, учитывающей как геометрию ткани, так и информацию о типах клеток, что позволяет эффективно обрабатывать целые изображения и решать проблемы гетерогенности и масштабируемости [58]. Параллельно создаются полуавтоматические инструменты, которые сочетают статистические модели с возможностью пользовательского контроля для обеспечения согласованности и воспроизводимости при определении порогов экспрессии маркеров, что сокращает время ручной аннотации [55]. Таким образом, несмотря на сохраняющиеся трудности, развитие методов глубокого обучения и специализированных вычислительных платформ позволяет добиваться все большей точности, масштабируемости и надежности в анализе данных мИФ [47, 57].

#### Пространственный анализ клеточного распределения

Ключевое преимущество мИФ заключается в разрешении метода и сохранении пространственной информации. Анализ пространственного распределения клеток позволяет понять архитектуру ТМО и оценить частоту взаимодействия различных клеточных популяций [38]. Так, в работе [21] проводилось исследование влияния пространственного распределения тучных клеток относительно других клеточных популяций на микрокружение редкой опухоли – фосфатурической мезенхимальной опухоли, секретирующей фактор роста фибробластов 23 (ФМТ). Использованный

подход позволил оценить потенциальный вклад тучных клеток в рост опухоли и ее способность секретировать FGF-23 посредством взаимодействия с CD31+ и CD163+ клетками.

Одним из базовых подходов является создание карт плотности распределения клеток определенного фенотипа, которые визуализируют области с высокой и низкой концентрацией (рис. 3) [38].

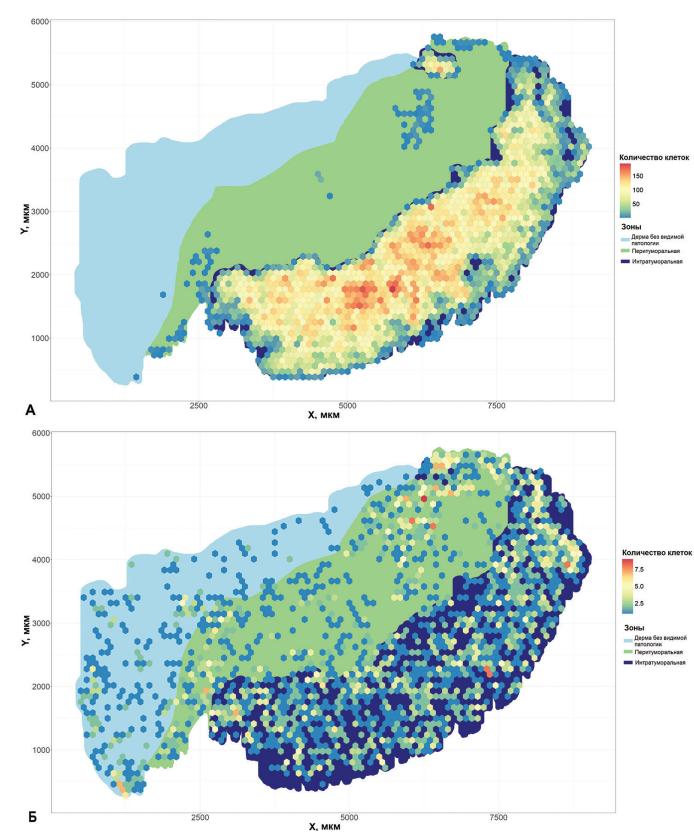
Анализ межклеточных расстояний является более сложной задачей, которая фокусируется на выявлении паттернов юкстаринного или паракринного взаимодействия между популяциями клеток, которые также могут быть визуализированы с помощью тепловых карт (рис. 4).

Один из таких методов – анализ ближайшего соседа (Nearest Neighbor, NN), при котором для каждой клетки-источника находится ближайшая клетка-мишень и измеряется расстояние между ними. Статистическое сравнение этих расстояний со случаем распределением позволяет определить, являются ли взаимодействия случайными, агрегированными или сегрегированными [38]. Более сложными являются функции пространственной статистики, такие как функция Ripley's K, которая оценивает количество соседей в пределах заданного радиуса от каждой клетки и сравнивает его с ожидаемым при полной пространственной случайности. Это позволяет количественно оценить степень кластеризации или рассредоточения клеток на разных пространственных масштабах [38].

### Программное обеспечение

**QuPath** является мощным и гибким программным обеспечением (ПО) с открытым исходным кодом и доступом [59]. Главным преимуществом данного ПО является возможность глубокой настройки и дополнения встроенных функций посредством написания пользовательских скриптов. Разработчики регулярно обновляют ПО с учетом современных тенденций и запросов, не только расширяя спектр его возможностей, но и делая его понятным в использовании для специалистов без навыков программирования.

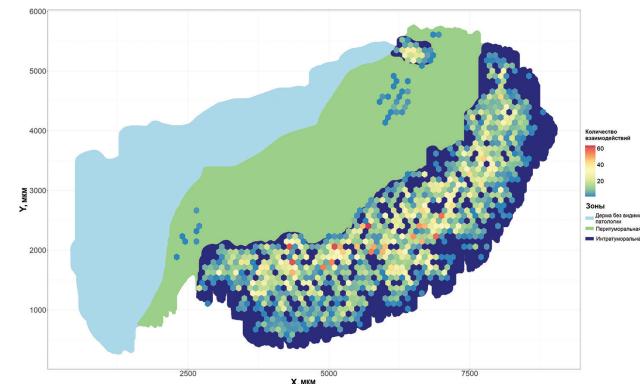
Исследования показывают высокую степень сопоставимости результатов (коэффициенты корреляции  $>0,89$ ) между QuPath и коммерческой платформой HALO при анализе плотности иммунных клеток и их пространственной организации [59]. Более того, QuPath можно интегрировать с внешними инструментами, такими как CytoMap, для выполнения продвинутого пространственного анализа, например, неконтролируемой кластеризации, что недоступно в HALO [59]. Платформа



**Рис. 3.** Карта плотности распределения клеток на всем срезе меланомы кожи, стадия IIa. Каждая ячейка, характеризующая количество клеток, имеет размер 100 мкм по обеим координатным осям.

А – Плотность распределения меланоцитов.

Б – Плотность распределения триптаза-позитивных тучных клеток.



**Рис. 4.** Карта плотности взаимодействия тучных клеток с меланоцитами на всем срезе меланомы кожи, стадия IIa. Каждая ячейка, характеризующая число взаимодействий, имеет размер 100 мкм по обеим координатным осям.

регулярно дополняется расширениями для совместимости и с другими важными инструментами и библиотеками для сегментации, в частности: ImageJ, Stardist, InstanSeg и другие.

Однако гибкость QuPath имеет и обратную сторону: результаты могут сильно зависеть от выбранных методов сегментации и фенотипирования. Например, в одном исследовании при сравнении с InForm была обнаружена сильная корреляция по общему числу клеток, но слабая – по количеству специфических субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3+, CD8+), что подчеркивает важность стандартизации методологии анализа [34].

**HALO** представляет собой коммерческую платформу, которая ценится за удобный пользовательский интерфейс и надежность в выполнении стандартных задач анализа [17]. Платформа использует модульный подход, включая ИИ-алгоритмы для сегментации и пороговые значения для фенотипирования, что обеспечивает высокую согласованность с QuPath по ключевым метрикам [50, 59]. Несмотря на удобство, HALO менее гибок по сравнению с QuPath и обладает меньшим набором аналитических возможностей [17].

**InForm** – это коммерческое программное обеспечение, тесно интегрированное с системами визуализации Vectra и PhenoImager от Akouya Biosciences. Его отличительной чертой является подход, основанный на машинном обучении, при котором программа "обучается" распознавать различные типы тканей и клеток на основе их морфологических и флуоресцентных характеристик [24, 27]. Этот подход может обеспечить высокую точность при правильной настройке. Однако InForm описывается как сложное решение, имеющее закрытый код, что затрудняет его широкое внедрение и сравнение с другими платформами [34]. Прямое сравнение с QuPath выявило значительные расхождения в результатах количественной оценки иммунных клеток, что указывает на то, что выбор программного обеспечения может критически влиять на выводы биомаркерных исследований [34].

В заключение, выбор программного обеспечения для анализа мИФ-данных зависит от конкретной задачи. **QuPath** является идеальным выбором для исследовательских лабораторий благодаря своей гибкости, широкому спектру функций и отсутствию лицензионных платежей. **HALO** подходит для стандартизованных и высокопроизводительных анализов в условиях, где важны удобство использования и воспроизводимость. **InForm** тесно связан с экосистемой Akouya

и предлагает мощный, хотя и сложный, подход на основе машинного обучения. Важно отметить, что метод анализа может существенно влиять на конечные результаты, что требует тщательной валидации и стандартизации рабочих процессов [29, 34].

### Заключение

Современные методы пространственного профилирования вносят прорывной вклад в понимание устройства тканевого микроокружения при различных патологических процессах. Если раньше клеточные взаимодействия рассматривались преимущественно в популяционном контексте, то благодаря современным технологиям мультиплексной визуализации и пространственного анализа становится возможной оценка нативной топологии ткани, с точностью до отдельной клетки.

Мультиплексная иммунофлуоресценция занимает ключевое место среди существующих методов благодаря высокой чувствительности, разрешению и высокому потенциалу для интеграции в клинические исследования. В сочетании с передовыми аналитическими инструментами – от классической пространственной статистики до графовых нейронных сетей [43, 58] – она обеспечивает переход от дескриптивного анализа к количественной модели ТМО, в которой можно прогнозировать межклеточные взаимодействия и терапевтический ответ.

Технологии мультиплексного окрашивания гистологических срезов, пространственного фенотипирования и цифрового профилирования предоставляют уникальные сведения о состоянии иммунного и стромального ландшафтов *in situ*, ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, а также роли межклеточных взаимодействий в реализации ключевых механизмов морфогенеза в норме и при патологии.

Тем не менее, остаются вызовы: стандартизация протоколов окрашивания, межлабораторная воспроизводимость [23, 49], а также стандартизация алгоритмов, используемых в программных инструментах [17, 59]. В перспективе развитие мультиомных интегративных подходов – объединяющих пространственную транскриптомику, протеомику и морфологию – позволит реконструировать тканевые системы как динамические, взаимодействующие сети.

Таким образом, мИФ технологии становятся не просто инструментом визуализации, а основой для развития функциональной морфологии, где количественная пространственная биология служит фундаментом для персонализированной

диагностики, прогностической медицины и разработке нового класса перспективных трансляционных биомаркеров.

## Литература

- Angelo M. et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors //Nature medicine. – 2014. – Т. 20. – №. 4. – С. 436-442. <https://doi.org/10.1038/nm.3488>
- Basu S. S. et al. Rapid MALDI mass spectrometry imaging for surgical pathology //NPJ precision oncology. – 2019. – Т. 3. – №. 1. – С. 17. <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0089-y>
- Berry S. et al. Analysis of multispectral imaging with the AstroPath platform informs efficacy of PD-1 blockade //Science. – 2021. – Т. 372. – №. 6547. – С. eaba2609. <https://doi.org/10.1126/science.aba2609>
- Butler A. E. et al. Recovery of high-quality RNA from laser capture microdissected human and rodent pancreas //Journal of histotechnology. – 2016. – Т. 39. – №. 2. – С. 59-65. <https://doi.org/10.1080/0147885.2015.1106073>
- Chang Q. et al. Imaging mass cytometry //Cytometry part A. – 2017. – Т. 91. – №. 2. – С. 160-169. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23053>
- Chen K. H. et al. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells //Science. – 2015. – Т. 348. – №. 6233. – С. aaa6090. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6090>
- Chen H. Y., Palendira U., Feng C. G. Navigating the cellular landscape in tissue: Recent advances in defining the pathogenesis of human disease //Computational and structural biotechnology journal. – 2022. – Т. 20. – С. 5256-5263. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.09.005>
- Chen A. et al. Large field of view-spatially resolved transcriptomics at nanoscale resolution //BioRxiv. – 2021. – Т. 2021.
- Christians A. et al. VistaPlex immunofluorescence assay panels provide reliable deep spatial phenotyping for diverse immuno-oncology applications //Cancer Research. – 2024. – Т. 84. – №. 6\_Supplement. – С. 5187-5187. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2024-5187>
- Datta S. et al. Laser capture microdissection: Big data from small samples //Histology and histopathology. – 2015. – Т. 30. – №. 11. – С. 1255. <https://doi.org/10.14670/HH-11-622>
- Dezem F. S. et al. Spatially resolved single-cell omics: Methods, challenges, and future perspectives //Annual Review of Biomedical Data Science. – 2024. – Т. 7. – №. 2024. – С. 131-153. <https://doi.org/10.1146/annurev-biodatasci-102523-103640>
- Dieci M. V. et al. Neoadjuvant chemotherapy and immunotherapy in luminal B-like breast cancer: results of the phase II GIADA trial //Clinical Cancer Research. – 2022. – Т. 28. – №. 2. – С. 308-317. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2260>
- Eng C. H. L. et al. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH+ //Nature. – 2019. – Т. 568. – №. 7751. – С. 235-239. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1049-y>
- Espina V. et al. Laser capture microdissection technology //Expert review of molecular diagnostics. – 2007. – Т. 7. – №. 5. – С. 647-657. <https://doi.org/10.1586/14737159.7.5.647>
- Gerlinger M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing //New England journal of medicine. – 2012. – Т. 366. – №. 10. – С. 883-892. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>
- Giesen C. et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry //Nature methods. – 2014. – Т. 11. – №. 4. – С. 417-422. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2869>
- Gonzalez A. D. et al. Digital pathology in tau research: A comparison of QuPath and HALO //Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. – 2025. – С. nlaf026. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlaf026>
- Hoyt C. C. Multiplex immunofluorescence and multispectral imaging: forming the basis of a clinical test platform for immuno-oncology //Frontiers in molecular biosciences. – 2021. – Т. 8. – С. 674747. <https://doi.org/10.3389/fmbo.2021.674747>
- Hu B. et al. A review of spatial profiling technologies for characterizing the tumor microenvironment in immuno-oncology //Frontiers in Immunology. – 2022. – Т. 13. – С. 996721. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.996721>
- Hwang K. et al. High-Throughput Automated Multiplex Immunofluorescence Assays for Translational Research //Journal of Visualized Experiments (JoVE). – 2025. – №. 220. – С. e67584. <https://doi.org/10.3791/67584>
- Kostin A. et al. Mast Cell Association with the Microenvironment of a Phosphaturic Mesenchymal Tumour Secreting Fibroblast Growth Factor 23 //Medical Sciences. – 2025. – Т. 13. – №. 3. – С. 195. <https://doi.org/10.3390/medsci13030195>
- Kwon Y. et al. Spatial Proteomics towards cellular Resolution //Expert Review of Proteomics. – 2024. – Т. 21. – №. 12. – С. 505-514. <https://doi.org/10.1080/14789450.2024.2445809>
- Laberiano-Fernández C. et al. Best practices for technical reproducibility assessment of multiplex immunofluorescence //Frontiers in Molecular Biosciences. – 2021. – Т. 8. – С. 660202. <https://doi.org/10.3389/fmbo.2021.660202>
- Laberiano C. et al. Develop a multiplex immunofluorescence panel to identification of distinct complex immune landscapes in pleural effusion liquids from patients with metastatic lung adenocarcinoma. – 2020. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-sitc2020.0670>
- Lin J. R. et al. Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes //eLife. – 2018. – Т. 7. – С. e31657. <https://doi.org/10.7554/eLife.31657>
- Locke D., Hoyt C. C. Companion diagnostic requirements for spatial biology using multiplex immunofluorescence and multispectral imaging //Frontiers in Molecular Biosciences. – 2023. –

- T. 10. – C. 1051491. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1051491>
27. Manikis G. et al. Abstract P1-02-28: PDGFR $\alpha$ +/FAP-fibroblasts at multiplex *in situ* resolution are associated with resistance to HER2 blockade in neoadjuvant treated HER2+ breast cancer: results from the Swedish PREDIX HER2 trial //Clinical Cancer Research. – 2025. – T. 31. – №. 12\_Supplement. – C. P1-02-28-P1-02-28. <https://doi.org/10.1158/1557-3265.sabcs24-p1-02-28>
28. Marlin M. C. et al. A novel process for H&E, immunofluorescence, and imaging mass cytometry on a single slide with a concise analytics pipeline // Cytometry Part A. – 2023. – T. 103. – №. 12. – C. 1010-1018. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24789>
29. McKendall A. K. et al. Basic Science and Pathogenesis // Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association. – 2024. – T. 20. – C. e093006. <https://doi.org/10.1002/alz.093006>
30. Merritt C. R. et al. Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue //Nature biotechnology. – 2020. – T. 38. – №. 5. – C. 586-599. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0472-9>
31. Miller B. F. et al. Reference-free cell type deconvolution of multi-cellular pixel-resolution spatially resolved transcriptomics data //Nature communications. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 2339. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30033-z>
32. Mori H. et al. Characterizing the tumor immune microenvironment with tyramide-based multiplex immunofluorescence //Journal of mammary gland biology and neoplasia. – 2020. – T. 25. – №. 4. – C. 417-432. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09479-2>
33. Mund A. et al. Deep Visual Proteomics defines single-cell identity and heterogeneity //Nature Biotechnology. – 2022. – T. 40. – №. 8. – C. 1231-1240. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01302-5>
34. Nikitin B. M. et al. QuPath versus InForm: Digital image analysis of multiplex immunofluorescence (mIF) tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) outcomes in an immunotherapy clinical trial //Cancer Research. – 2021. – T. 81. – №. 13\_Supplement. – C. 1665-1665. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2021-1665>
35. Oliveira M. F. et al. High-definition spatial transcriptomic profiling of immune cell populations in colorectal cancer //Nature Genetics. – 2025. – C. 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41588-025-02193-3>
36. Park J. et al. High-level multiplexed virtual immunofluorescence staining using holotomography and deep learning //Cancer Research. – 2024. – T. 84. – №. 6\_Supplement. – C. 7401-7401. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2024-7401>
37. Parra E. R. et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 13380. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13942-8>
38. Parra E. R. Methods to determine and analyze the cellular spatial distribution extracted from multiplex immunofluorescence data to understand the tumor microenvironment //Frontiers in Molecular Biosciences. – 2021. – T. 8. – C. 668340. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.668340>
39. Pennie R. L. et al. PixlMap: A generalisable pixel classifier for cellular phenotyping in multiplex immunofluorescence images //bioRxiv. – 2025. – C. 2025.01. 08.632002. <https://doi.org/10.1101/2025.01.08.632002>
40. Viratham Pulsawatdi A. et al. A robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow for the characterisation of the tumour immune microenvironment //Molecular oncology. – 2020. – T. 14. – №. 10. – C. 2384-2402. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12764>
41. Ram S., Powell E. 54 A strategy to quantitatively assess the accuracy and precision of multiplex immunofluorescence assays-application to Ultivue Insituplex® PD-L1, T-act and APC panels //Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2021. – T. 9. – №. Suppl 2. – C. A61-A61. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-sitc2021.054>
42. Rodrigues S. G. et al. Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution //Science. – 2019. – T. 363. – №. 6434. – C. 1463-1467. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1219>
43. Sankaranarayanan A. et al. Quantitative benchmarking of nuclear segmentation algorithms in multiplexed immunofluorescence imaging for translational studies //Communications Biology. – 2025. – T. 8. – №. 1. – C. 836. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08184-8>
44. Porta Siegel T. et al. Mass spectrometry imaging and integration with other imaging modalities for greater molecular understanding of biological tissues // Molecular imaging and biology. – 2018. – T. 20. – №. 6. – C. 888-901. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1267-y>
45. Ståhl P. L. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics //Science. – 2016. – T. 353. – №. 6294. – C. 78-82. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2403>
46. Stickels R. R. et al. Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2 //Nature biotechnology. – 2021. – T. 39. – №. 3. – C. 313-319. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0739-1>
47. Tahir W. et al. Development of a high-throughput image processing pipeline for multiplex immunofluorescence whole slide images at scale //Cancer Research. – 2023. – T. 83. – №. 7\_Supplement. – C. 6616-6616. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2023-6616>
48. Tan W. C. C. et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy // Cancer Communications. – 2020. – T. 40. – №. 4. – C. 135-153. <https://doi.org/10.1002/cac2.12023>
49. Taube J. M. et al. Multi-institutional TSA-amplified multiplexed immunofluorescence reproducibility evaluation (MITRE) study //Journal for immunotherapy of cancer. – 2021. – T. 9. – №. 7. – C. e002197. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002197>
50. Teplitz K. et al. 56 Quantitative evaluation of the tissue micro-environment by high-resolution 17-plex immunofluorescence reveals distinct cell populations //Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2021.

- Т. 9. – №. Suppl 2. – С. A64-A64. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-sitc2021.056>
51. Villarroel-Espindola F. et al. Multiplexed analysis of fixed tumor tissues using imaging mass cytometry // Cancer Research. – 2017. – Т. 77. – №. 13\_Supplement. – С. 1635-1635. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2017-1635>
52. Wang G. et al. Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy //Methods. – 1999. – Т. 18. – №. 4. – С. 459-464. <https://doi.org/10.1006/METH.1999.0813>
53. Wang N. et al. Spatial transcriptomics and proteomics technologies for deconvoluting the tumor microenvironment //Biotechnology journal. – 2021. – Т. 16. – №. 9. – С. 2100041. <https://doi.org/10.1002/biot.202100041>
54. Wilson C. M. et al. Challenges and opportunities in the statistical analysis of multiplex immunofluorescence data //Cancers. – 2021. – Т. 13. – №. 12. – С. 3031. <https://doi.org/10.3390/cancers13123031>
55. Xiong J. et al. GammaGateR: semi-automated marker gating for single-cell multiplexed imaging //Bioinformatics. – 2024. – Т. 40. – №. 6. – С. btac356. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac356>
56. Yaseen Z. et al. Validation of an accurate automated multiplex immunofluorescence method for immuno-profiling melanoma //Frontiers in molecular biosciences. – 2022. – Т. 9. – С. 810858. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.810858>
57. Yosofvand M. et al. Spatial immunophenotyping from whole-slide multiplexed tissue imaging using convolutional neural networks //bioRxiv. – 2024. – С. 2024.08. 16.608247. <https://doi.org/10.1101/2024.08.16.608247>
58. Yun S. et al. Mew: Multiplexed immunofluorescence image analysis through an efficient multiplex network //European Conference on Computer Vision. – Cham : Springer Nature Switzerland, 2024. – С. 127-144. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2407.17857>
59. Zhang W. et al. Comparison of QuPath and HALO platforms for analysis of the tumor microenvironment in prostate cancer //bioRxiv. – 2025. – С. 2025.05. 16.654590. <https://doi.org/10.1101/2025.05.16.654590>.

#### Контакты авторов:

Атыкишин Дмитрий Андреевич  
e-mail: atyakshin\_da@pfur.ru

**Конфликт интересов:** отсутствует