

Současné metody multiplexní imunohistochemie pro analýzu fixovaných tkáňových vzorků

Romana Hendrychová¹, Kateřina Čížková², Dominik Hraboš¹, Jan Bouchal¹

¹ Ústav klinické a molekulární patologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

² Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

SOUHRN

V klinické praxi se primárně využívají tradiční histopatologické metody, jako je barvení hematoxylinem a eozinem nebo chromogenní imunohistochemie, které jsou limitovány v možnostech simultánní detekce více biomarkerů a analýzy prostorových vztahů mezi buněčnými populacemi. Tato omezení překonávají metody multiplexní imunohistochemie (mIHC), jež umožňují detailní prostorovou analýzu tkání fixovaných ve formalinu a zalitých do parafínu s detekcí více epitopů v jednom vzorku. Podrobnější charakterizace imunitních buněčných populací v nádorovém mikroprostředí například přispěla k rozvoji imunoterapeutických přístupů, které zásadně změnily prognózu mnoha pokročilých malignit. Moderní multiplexní metody využívají jak chromogenní, tak imunofluorescenční detekci a zahrnují techniky sekvenčního cyklického značení či tyraminem zesílené amplifikace signálu. Alternativní přístupy, jako je využití protilátek konjugovaných s nukleotidovými značkami, umožňují vysoce specifickou detekci a usnadňují kvantitativní analýzu, zatímco hmotnostně spektrometrické přístupy detekují rozsáhlé panely biomarkerů. Navzdory výraznému technologickému pokroku zůstává zavedení mIHC do rutinní klinické diagnostiky výzvou, a to zejména s ohledem na potřebu standardizace, validace protilátek, integrace pokročilé digitální analýzy obrazových dat a regulace laboratorně vyvinutých testů. S pokračující automatizací a digitalizací patologie lze očekávat širší využití mIHC v klinické praxi, což by mohlo významně přispět k hlubší charakterizaci nádorů a jejich efektivnější léčbě.

Klíčová slova: multiplexní imunohistochemie – imunofluorescence – hmotnostní spektrometrie – digitální patologie

Current methods in multiplex immunohistochemistry for formalin-fixed tissue samples

SUMMARY

Traditional histopathological methods, such as hematoxylin and eosin staining and chromogenic immunohistochemistry, are still primarily used in clinical practice, however, they are limited in their ability to simultaneously detect multiple biomarkers and analyze spatial relationships between cell populations. These limitations are overcome by multiplex immunohistochemistry (mIHC) methods that allow detailed spatial analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissues with detection of multiple epitopes in a single sample. Detailed characterization of immune cell populations within tumor microenvironment has significantly contributed to the development of immunotherapeutic approaches, which have fundamentally transformed the prognosis of many advanced malignancies. Modern multiplex methods use both chromogenic and immunofluorescence detection and include sequential cyclic labeling or tyramine signal amplification techniques. Alternative approaches, such as the use of nucleotide-conjugated antibodies, allow highly specific detection and facilitate quantitative analysis, while mass spectrometry-based approaches enable the profiling of extensive biomarker panels. Despite significant technological advances, the integration of mIHC into routine clinical diagnostics remains challenging, primarily due to the need for standardization, antibody validation, advanced image data analysis integration, and the regulation of laboratory-developed tests. With the continued automation and digitization of pathology, wider use of mIHC in clinical practice can be expected, which could significantly contribute to the deeper characterization of tumors and improved therapy.

Keywords: multiplex immunohistochemistry – immunofluorescence – mass spectrometry – digital pathology

Cesk Patol 2025; 61(4): 209–219

Tkáňová diagnostika z formalínem fixovaných a parafinem zalitých preparátů (FFPE) je primárně založena na rutinním barvení hematoxylinem a eozinem (H&E), které je často doplňováno chromogenní imunohistochemií (IHC) za účelem detekce specifických antigenů in situ (1–3). Detekce proteinů je zásadní pro histopatologickou diagnostiku, objasnění patogeneze a patofyziologie onemocnění i rozhodování o léčbě (1). Metodika IHC zahrnuje několik základních kroků, a to přípravu tkáně, zhotovení parafinových řezů, odmaskování epitopu, blokování nespecifických vazeb, inkubaci imunoglobulinů a vizualizaci kýžených antigenů. Každý krok musí být pečlivě optimalizován pro zajištění přesných a reprodukovatelných výsledků (4).

✉ Adresa pro korespondenci:

doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FNOL

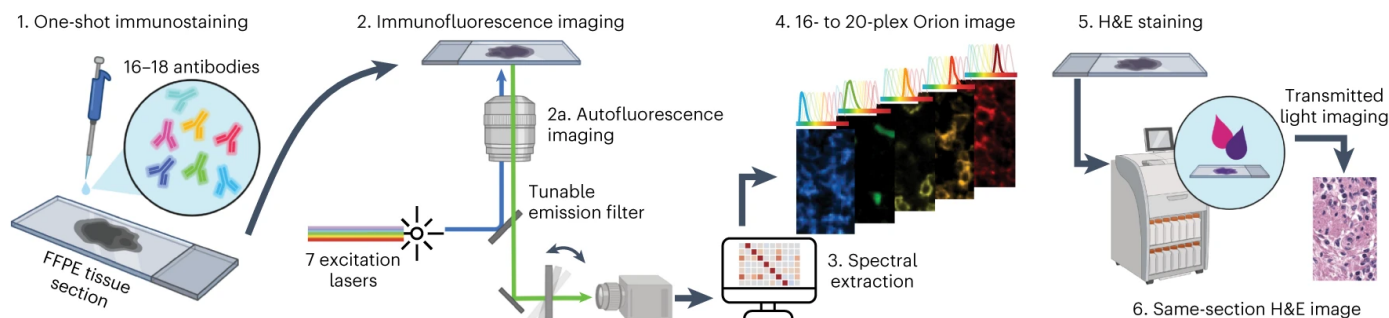
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

tel.: +420 585632451

e-mail: jan.bouchal@upol.cz

Vizualizace může být chromogenní (enzym a chromogen) či imunofluorescenční (IF) (4). Obě metody lze provést přímým způsobem (jedna konjugovaná protilátka) nebo nepřímým (sekundární protilátka s konjugátem) (5), přičemž nepřímá metoda zvyšuje intenzitu signálu a citlivost (6,7). Chromogenní preparáty umožňují snadnou archivaci, opakovatelné pozorování pod světelným mikroskopem a jsou nákladově efektivnější (2,8). Oproti tomu IF značení nabízí vyšší citlivost, možnost modulace signálu fluoroforu a detekce širší škály exprimovaných proteinů současně (9).

Pro diagnostiku a cílenou léčbu často nestačí vyšetření pouze jediného proteinu (7). Konvenční IHC vyžaduje samostatné řezy pro každý antigen, což může vést k vyčerpání materiálu a znemožnění dalších analýz. Multiplexní imunohistochemie (mIHC) tento problém překonává. Umožňuje komplexní analýzu tkáně, zahrnující interakce buněk a proteinů i jejich prostorových uspořádání, což přispívá k hlubšímu pochopení patologických mechanismů. Zmíněná analýza je vhodná jak pro efektivní predikci odpovědi na léčbu, tak pro studium nádorového mikroprostředí (tzv. tumor microenvironment, TME) (10). Tento přehledový článek poskytuje ucelený přehled současného stavu aplikací a přístupů mIHC v oblasti molekulární patologie.



Obr. 1. Schéma jednorázového multiplexního značení pomocí platformy Orion. Emisní spektra fluoroforů jsou postupně rozlišována pomocí sedmi excitačních laserů a laditelných optických filtrů. Následně je možno stejný řez nabarvit H&E a doplnit sken v režimu brightfield. Převzato z (17).

Multiplexní chromogenní a imunofluorescenční imunohistochemie

Multiplexní IHC poskytuje komplexní analýzu tkání (7). Tato metoda je obzvláště cenná pro detailní analýzu imunitních a nádorových signálních drah včetně jejich prostorového uspořádání v rámci jediného FFPE řezu, což přispívá k přesnější klasifikaci pacientů pro imunoterapii a k identifikaci potenciálních biomarkerů pro predikci odpovědi na léčbu (11). Přesto implementace mIHC do rutinních klinických laboratoří je dosud omezená, a to zejména kvůli vyšším nákladům, delší době zpracování a potřebě specializovaných znalostí pro optimalizaci, validaci i digitální analýzy. V současnosti je k dispozici omezené množství validačních studií zaměřených na hodnocení diagnostické účinnosti platform mIHC. Zároveň chybí schválené komerční farmaceutické aplikace (tzv. companion diagnostics, CDx) a mIHC technologie aktuálně nesplňují požadavky stanovené pro diagnostické testy in vitro (IVD) (12,13). Rovněž sférická překážka mezi jednotlivými protilátkami a antigeny může ovlivňovat detekci jednotlivých proteinů (2). Z těchto důvodů je pečlivá optimalizace a validace zásadní pro zajištění spolehlivosti a reprodukovatelnosti napříč laboratořemi (3).

Metoda mIHC je principiálně stejná jako konvenční IHC, avšak s tím hlavním rozdílem, že na jednom řezu je hodnoceno několik markerů současně (Obr. 1, Tab. 1, 2). Detekce antigenů u mIHC je stále umožněna enzymaticky nebo fluorescenčně (2,3,8). Pro chromogenní mIHC je poněkud limitující rozsah vlnových délek pohybující se pouze v oblasti viditelného spektra, a navíc i úzká škála dostupných činidel a chromogenů. Zmíněné nevýhody jsou schopny překonávat některé IF přístupy (14). IF multiplexování lze využít pro značení desítek až stovek biomarkerů. (15). Oproti klasické IHC však vyžaduje hodnocení jednotlivých biomarkerů pečlivé sladění vybraných protilátek a detekčních metod i pokročilou digitální analýzu obrazu pro smysluplnou interpretaci (14,16,17). K řešení těchto omezení byla vyvinuta řada pokročilých technik mIHC, které jsou komentovány v dalších kapitolách (2,18–25).

Sekvenční značení s opakovaným snímáním

Sekvenční značení využívá přístup cyklické mIHC, který sdílí klíčové principy s klasickou IHC. Tato metodika je rozšířena o postupy umožňující opakovanou aplikaci různých protilátek na tentýž tkáňový vzorek. Tento proces zahrnuje detekci antigenů, digitalizaci obrazu a případně odstranění krycího skla i chromogenního produktu či inaktivaci fluoroforu, v závislosti na použité metodě. Celý cyklus je následně opakován pro další antigeny. Výsledné digitální snímky jednotlivých cyklů jsou následně sloučeny do jednoho komplexního obrazu (18–23).

Na chromogenním podkladu je založena metoda multiplexního imunohistochemického konsektivního barvení na jednom

sklíčku (tzv. Multiplexed Immunohistochemical Consecutive Staining on Single Slide, MICSSS). Jedná se o odnož cyklické mIHC detekující až 10 biomarkerů na jediném tkáňovém řezu (18–20). MICSSS umožňuje značení jak membrán, tak i jader bez sterických překážek díky účinnému odbarvování a blokování protilátek mezi cykly. Pro efektivní odstranění chromogenů mezi jednotlivými cykly je nutné, aby byly vybrány pouze substráty rozpustné v organickém rozpouštědle (19). Ačkoli tato metoda přináší značné výhody pro současnou analýzu mnoha antigenů, včetně současného zpracování přibližně 30 preparátů, existují jistá omezení. Mezi ně patří potenciální poškození tkáně a snížení kvality obrazu v důsledku opakovaného zpracování (3,19). Tento přístup je také časově náročný, a to jak samotným barvením (každý cyklus trvá v průměru 6–7 hodin), tak i tvorbou panelu protilátek a chromogenů (18,19). Každý sledovaný protein musí být testován v různých pozicích v panelu, aby se ověřila jeho kompatibilita s ostatními markery a stabilita signálu při opakovaném zpracování tkáně. Pořadí značení má zásadní vliv na kvalitu a kvantifikaci výsledků, a proto je nezbytné provádět pravidelné revalidace panelů, zejména při změně nebo doplnění dalších vyšetřovaných proteinů (3).

Další technologií na bázi chromogenní mIHC je sekvenční imunoperoxidasové značení a odstraňování (tzv. Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing, SIMPLE). Jedná se o nepřímou metodu s využitím peroxidázového substrátu 3-amino-9-ethylkarbazol (AEC) k vizualizaci proteinů. Metodika začíná rehydratací FFPE řezů, po níž následuje slabé obarvení jader hematoxylinem. Barvení je stabilizováno krátkou expozicí v alkalickém roztoku – nejčastěji zředěném NH_4OH . Po tomto kroku je preparát poprvé naskenován. Následuje aplikace protilátky a substrátu AEC. Po zachycení snímku je AEC alkoholem odstraněn a značení je vymyto oxidativním roztokem obsahujícím kyselý KMnO_4 , což umožňuje další cyklus barvení. Výsledné snímky jsou analyzovány jednotlivě nebo digitálně sloučeny. Detekce je omezena na 12 biomarkerů, přičemž klíčovým limitujícím faktorem pro rozšíření panelu je pravděpodobně zhoršení fyzické integrity tkáně způsobené častou manipulací a opakovanými dehydratacemi vzorku (7,26).

Metoda vícenásobné epitopové ligandové kartografie (tzv. Multi-Epitope Ligand Cartography, MELC) umožňuje simultánní vizualizaci proteinové exprese za využití IF značení, přičemž fluorofor je po každém cyklu značení odstraněn řízeným fotovybělováním (15,27–30). Tento přístup spočívá v opakovaném cyklickém barvení protilátkami konjugovanými s fluorofory. Následuje snímání pomocí vysoce citlivé digitální kamery a odstranění signálu prostřednictvím světelné expozice. Tímto způsobem je umožněno další barvení a je tak možné detekovat desítky markerů na jednom řezu (12,28–31). Tento přístup byl dále rozvinut metodou Toponome Imaging System (TIS™), která

umožňuje detekci až 100 markerů v jediné buňce (32). Výsledné snímky jsou poté překrývány pro analýzu koexprese. Nicméně snímání je z časových důvodů omezeno pouze na definované oblasti zájmu (ROI) u jednotlivých cyklů (12,28–31). MELC nemusí být optimální metodou pro analýzu tkáňových vzorků se zvýšenou autofluorescencí, což je zvláště problematické u některých archivních FFPE vzorků (31). Mezi další významné faktory také patří zvýšené náklady související s potřebou použití robotického invertovaného mikroskopu (15).

Na rozdíl od metody MELC, která je typicky omezena na snímání ROI, umožňuje metoda cyklické imunofluorescence (CycIF) snímání celých preparátů (7,28). Jedná se o metodu postupného cyklického značení, při němž jsou v každém cyklu aplikovány dvě až tři protilátky, které mohou být přímo nebo nepřímo konjugovány s různými fluorofory. Po každém kole značení jsou jednotlivé markery nasnímány. Fluorofory jsou před každým dalším cyklem chemicky nebo fotochemicky inaktivovány. Tímto přístupem lze detekovat více než 60 proteinů. Podobně jako u chromogenní cyklické mIHC, je zde stále časová náročnost při sestavování panelu, ale stejně tak i delší doba každého cyklu barvení (7,12,33–35).

Alternativou je technologie MACSima™ Imaging Cyclic Staining (MICS) od Miltenyi Biotec, která vykazuje vysokou citlivost a dynamický rozsah. Využití cyklického barvení umožňuje MICS dosáhnout lineárního dynamického rozsahu v pěti řádech. Tento systém je plně automatizovaný, zahrnuje robotickou manipulaci, automatické podávání reagentů a skener. Zobrazovací systém MACSima™ využívá cyklické imunofluorescenční barvení, promývání vzorku, širokoúhlé mikroskopické snímání a eliminaci signálů pomocí fotovybělování nebo uvolněním konjugátů specifickými činidly. Každý cyklus zahrnuje aplikaci tří fluoroforem značených protilátek. Metoda integruje pokročilé algoritmy pro zpracování obrazu, včetně korekce autofluorescence a zobrazování s vysokým dynamickým rozsahem, což zajišťuje přesnou prostorovou a fenotypovou charakterizaci buněk. Tento přístup umožňuje aplikaci více než 100 protilátek na jeden FFPE vzorek a zahrnuje knihovnu konjugátů pokrývajících 554 epitopů (36,37).

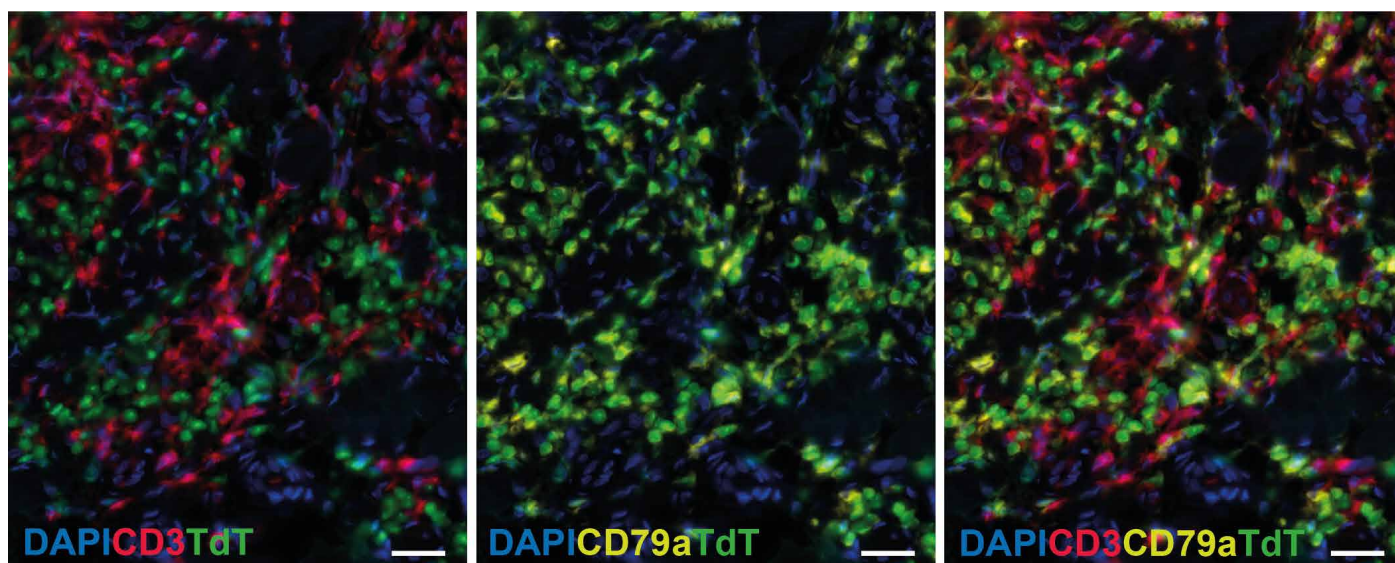
Další cyklickou metodou je COMET™ od firmy Lunaphore Technologies. Jedná se o plně automatizovanou platformu zalo-

ženou na mikrofluidní technologii pracující s běžně dostupnými reagenty. Barvicí jednotka obsahuje mikrofluidní čip, který zkracuje inkubační dobu z více než 1 hodiny na méně než 5 minut. Čip je umístěn na sklíčku s tkání a společně vytváří reakční komoru, jejíž oblast je vymezena těsnicí vložkou a přitlačována pístem. Reagencie jsou v komoře cirkulovány přes vzorek, přičemž teplota je řízena Peltierovým článkem pod sklíčkem (38).

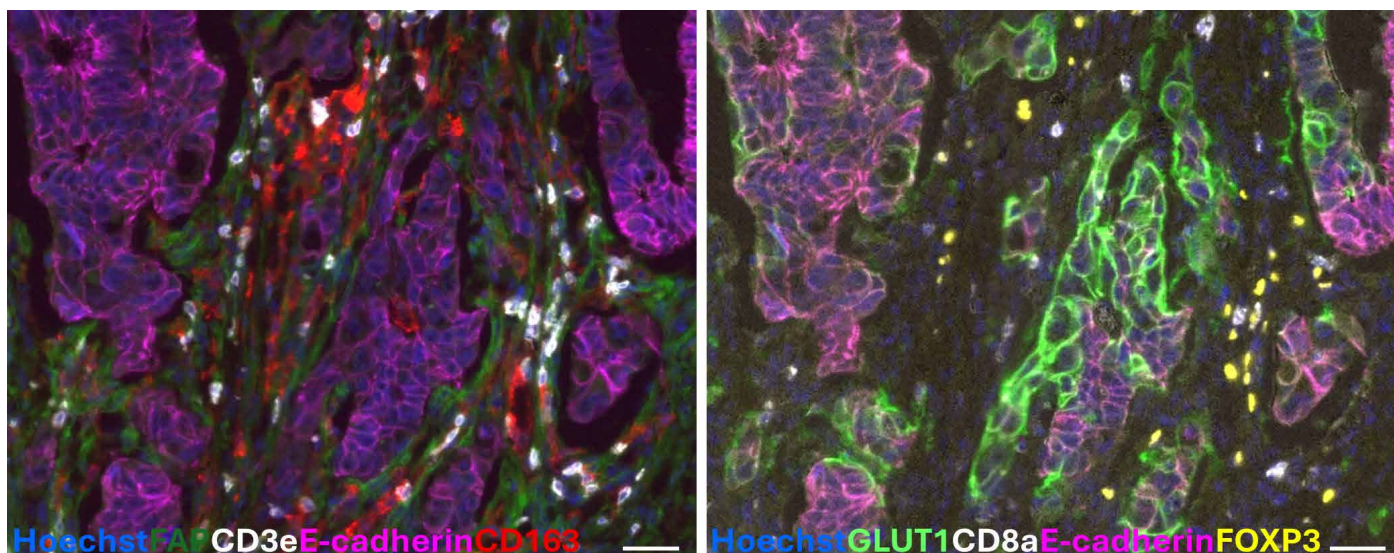
Tyramidová amplifikace signálu

Tyramidová amplifikace signálu (tzv. Tyramide Signal Amplification, TSA) představuje jednoduchou modifikaci konvenční nepřímé IHC. Místo 3,3'-diaminobenzidinu (DAB), jež bývá nejčastěji aplikován, se jako substrát pro enzym používají chromogeny či fluorofory navázané na tyramid (43,44). Enzym (nejčastěji křenová peroxidáza či alkalická fosfatáza) konjugovaný se sekundární protilátkou aktivuje tyramid, který se kovalentně váže i s detekční značkou na tyrozinové zbytky v bezprostřední blízkosti původního epitopu. Po odstranění komplexu primární a sekundární protilátky lze tento proces opakovat, přičemž výhodou je možnost použití protilátek ze stejného zvířecího zdroje. To umožňuje efektivní multiplexní detekci antigenů (Obr. 2) (15,28,45). Existují i další modifikace TSA, jež zahrnují tyramid konjugovaný s biotinem anebo dinitrofenylem. Jedná se o hapteny poskytující více vazebných míst pro následnou detekci pomocí streptavidinu či protilátek spojených s reportérovými molekulami, čímž přispívají ke zvýšení citlivosti metody (45). Amplifikační techniky jsou zejména cenné pro detekci slabých a těžce detekovatelných signálů, které je obtížné hodnotit pomocí klasických IHC, jako je například exprese arginázy-1 v makrofázích či PD-L1 u komplexních malignit (10,28,46).

TSA poskytuje lepší prostorové rozlišení než DAB nebo AEC, jelikož při jejich využití mohou reakční produkty difundovat mimo místa enzymové aktivity. Díky zvýšené citlivosti TSA lze snížit koncentraci primární protilátky dvakrát až padesátkrát oproti konvenční IHC, což vede k vysoce specifickému signálu s minimálním pozadím. To přispívá ke zlepšení poměru signálu k šumu, jasnějšímu zobrazení buněk a detekci subcelulárních struktur, které by jinak nebyly viditelné (45). Navíc tento přístup je nákladově srovnatelný s chromogenními IHC a umožňuje použití více druhově podobných primárních protilátek (15).



Obr. 2. Reprezentativní mikrofotografie vzorku B-lymfoblastické leukemie/lymfomu v kůži s multiplexním značením a tyramidovou amplifikací signálu. Detekce byla provedena pomocí fluoroforů Opal™ (Akoya Biosciences): Opal 520 (zeleně; TdT, polyklonální protilátka, Roche), Opal 570 (žlutě; CD79a, klon JCB117, Dako) a Opal 690 (červeně; CD3 klon 2GV6, Roche). Buněčná jádra byla obarvena DAPI (tmavě modrá). Snímky byly pořízeny pomocí skeneru Olympus VS200 za použití světelného zdroje X-Cite XYLIS II (Excelitas Technologies). Měřítka odpovídá 20 µm.



Obr. 3. Reprezentativní mikrofotografie vzorku kolorektálního karcinomu získaná multiplexní imunohistochemií na platformě Orion. Značení bylo provedeno pomocí fluoroform konjugovaných primárních protilátek (RareCyte): anti-human FAP (EPR20021) konjugovaná s ArgoFluor™ 602 (tmavě zelená), anti-human CD3e (D7A6E) s ArgoFluor™ 686 (bílá), anti-human E-cadherin (4A2) s ArgoFluor™ 730 (růžová), anti-human CD163 (EPR14643) s ArgoFluor™ 760 (červená), anti-human GLUT1 (EPR3915) s ArgoFluor™ 580L (zelená) anti-human CD8a (AMC908) s ArgoFluor™ 624 (bílá) a anti-human FOXP3 (236A/E7) detekovaná pomocí digoxigeninem značené protilátky a sekundární protilátky mouse-anti-digoxin (HY-A.1) konjugované s ArgoFluor™ 784 (žlutá). Buněčná jádra byla obarvena Hoechst barvivem (tmavě modrá). Snímky byly pořízeny pomocí skeneru Orion (RareCyte). Měřítka odpovídá 20 µm.

Využití IF značení pro mIHC s sebou nese také některá úskalí. Existuje totiž riziko tzv. deštníkového efektu způsobeného nadměrným působením tyramidu (10). Označuje se tak jev, při kterém přítomnost dříve naneseného markeru na tkáňovém řezu brání aplikaci dalšího markeru, který se s ním prostorově překrývá, což může vést ke zkreslení výsledků při detekci více biomarkerů ve stejném buněčném kompartmentu (47). To vyžaduje důkladné hodnocení jednotlivých markerů během optimalizace, detailní analýzu pozitivních a negativních kontrol a zároveň pokročilou digitální analýzu. Dalším omezením je počet protilátek v panelu, který je limitován spektrálním překryvem fluoroforů (10). IF metoda TSA, známá pod pojmem Opal od výrobce Akoya Biosciences, umožňuje multiplexní detekci až 9 různých biomarkerů v jednom panelu, přičemž tkáň lze analyzovat v rámci jediného snímacího cyklu. (2,10,24,25,47).

Optimalizované chromogeny pro mIHC oproti tradičním chromogenům, jež mají tendenci se nasýtit a neumožňují překrývání, dokážou generovat třetí barvu, čímž jsou schopné detekce 4 až 5 markerů na jednom preparátu (např. od firmy Roche). Zároveň touto technikou lze snadno zobrazit jednotlivé markery pomocí světelného mikroskopu, avšak jejím omezením nadále zůstává úzký dynamický rozsah a spektrální překrývání signálu (2,8).

Protilátky konjugované s DNA značkami

Protilátky konjugované s DNA představují efektivní přístup multiplexování díky nukleotidové specifitě. Tento koncept vedl k rozvoji metod např. kódování pomocí indexování (tzv. CO-Detection by indEXing, CODEX) (48,49), imunohybridizační řetězové reakce (tzv. Immuno-Hybridization Chain Reaction, Immuno-HCR) (50,51), výměnného zobrazování DNA (tzv. DNA Exchange Imaging, DEI) (52), imunobarvení se zesílením signálu výměnnou reakcí (tzv. Immunostaining with Signal Amplification By Exchange Reaction, Immuno-SABER) (53), InSituPlex® (54), SignalStar™ (55) či digitálního prostorového profilování (tzv. Digital Spatial Profiling, DSP) (56). Tyto metody z principu kombinují imunobarvení s imunoglobuliny konjugovanými se specifickými oligonukleotidy a hybridizaci komplementárních DNA

sekvencí navázaných na fluoroformy. Po nabarvení tkáňového řezu směsí několika DNA-kódovaných protilátek dochází v jednotlivých cyklech k hybridizaci vybraných komplementárních sond, jejich fluorescenční detekci a následnému vymytí před dalším cyklem. V každém cyklu je obvykle zahrnuto i jaderné barvení (např. DAPI nebo Hoechst) umožňující přesné překrytí jednotlivých snímků (48–50,52,53,57). DSP využívá alternativní přístup detekce, a proto se v některých klíčových aspektech metodicky liší od výše uvedených technik (56).

Na rozdíl od některých jiných multiplexních metod postrádají DEI a CODEX mechanismus amplifikace signálu, což může negativně ovlivnit citlivost detekce, a to zejména u slabě exprimovaných epitopů (49,52). Oproti tomu Immuno-SABER tento nedostatek kompenzuje využitím dlouhých oligonukleotidových DNA řetězců pro zesílení signálu. Tyto prodloužené oligonukleotidové řetězce však často obtížně pronikají do kompaktnějších či silnějších tkáňových vzorků, což omezuje maximální tloušťku vzorku vhodného pro analýzu (53). Immuno-HCR je izotermní neenzymatická metoda pro in situ amplifikaci signálu, při které se po navázání DNA-konjugované protilátky spustí polymerizační reakce fluorescenčně značených DNA vláseček iniciovaných specifickou sekvencí. Tento přístup umožňuje multiplexní detekci vícero epitopů současně prostřednictvím unikátních iniciačních sekvencí pro každou protilátku (51). V porovnání s Immuno-SABER využívá tento přístup kratší nukleotidové sekvence, které snadno pronikají do tkání (50). Amplifikaci signálu využívají i robustní technologie, jako jsou InSituPlex® nebo SignalStar™, nicméně jejich multiplexní kapacita je omezena na detekci maximálně 12 epitopů na témž preparátu (54, 55).

Metoda DSP od společnosti NanoString využívá oligonukleotidové značky navázané na protilátku nebo RNA sondy prostřednictvím UV-fotoštěpitelných linkerů. Současně s tímto analytickým panelem jsou na stejný řez aplikovány také fluorescenčně značené protilátky, které slouží výhradně k vizualizaci morfologie tkáně a umožňují přesné určení ROI. Po digitálním zobrazení tkáňového řezu na základě signálu z těchto IF markerů jsou definované ROI selektivně ozářeny UV světlem, což vede k uvolnění indexovaných oligonukleotidů z analytických sond.

Uvolněné oligonukleotidy jsou následně zachyceny a kvantifikovány pomocí systému nCounter® nebo NGS, čímž je umožněna multiplexní analýza ve více ROI v průběhu 1,5 až 2,5 dne (56,58). Přestože DSP nezachycuje celý řez, umožňuje prostorové zobrazení dat z ROI, typicky ve formě heatmap. Při snaze o plošné pokrytí celého řezu velmi malými ROI však náklady na dosažení vysokého rozlišení neúnosně stoupají (3).

Využití hmotnostní spektrometrie

Přístupy mIHC zahrnují i metody založené na hmotnostní cytometrii, jako je CyTOF (Cytometry by Time Of Flight). Namísto fluoroforů či chromogenů jsou protilátky značeny stabilními izotopy kovů, jež lze snadno rozlišit na základě poměru hmotnosti iontů k jeho náboji (m/z). Pomocí laseru nebo iontového paprsku dochází k postupné ablaci značené tkáně. Po rozprášení s následnou ionizací jsou jednotlivé izotopy analyzovány hmotnostní spektrometrií (MS), což umožňuje přesnou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých značených protilátek. Výsledkem je detailní mapa distribuce proteinů v tkáni s vysokým prostorovým rozlišením (7,16,59,60). Metoda CyTOF byla základním pilířem pro vývoj dalších metod jako je zobrazovací hmotnostní cytometrie (tzv. Imaging Mass Cytometry, IMC) (61) či multiplexní zobrazování iontovým svazkem (tzv. Multiplexed Ion Beam Imaging, MIBI).

Metoda IMC využívá laserový ablační systém s vysokým rozlišením, který umožňuje odpařování tkáňových vzorků s následným přenosem iontů do CyTOF pro detekci kovových izotopů. Tento přístup umožňuje dosáhnout rozlišení až na subcelulární úrovni, což přispívá k detailnímu popisu prostorové exprese proteinů a buněčných interakcí v tkáních. To umožňuje hluboké poznání tkáňové a nádorové biologie. I přes nesčetné množství výhod IMC sahající od schopnosti detekce mnoha proteinů, eliminace autofluorescence, vyšší komplexity dat až po vysokou kvantitativní přesnost analýzy, existují také některé limitace. Mezi ně patří omezené pokrytí a zobrazení oblasti tkání, nižší rychlost snímání obrazu, nedostatek zesílení signálu a zvýšené pořizovací a provozní náklady (7,61). MIBI je založena na přístupu hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů. Po aplikaci konjugovaných protilátek a vysušení vzorku se povrch preparátu skenuje svazkem primárních iontů (např. O_2^+), čímž se uvolňují izotopové reportéry specifické pro protilátky vázané na povrchu vzorku jako sekundární ionty. Konjugáty jsou poté kvantifikovány opakovaným skenováním stejného zorného pole, přičemž každým skenem je možná detekce až sedmi izotopových reportérů (62). Obě tyto technologie umožňují současně zobrazit přítomnost, množství, umístění a funkční stav desítek až stovek biomarkerů (61,62). Tento postup předpokládá, že pro všechny cíle bude dostačující jednotný protokol pro odhalení antigenu, což nemusí platit pro každý panel (16).

Tabulka č. 1. Srovnání vybraných sekvenčních metod multiplexní analýzy FFPE tkáňových vzorků.

Název metody	Prodejce	Multiplexita	Barvení více protilátek v jednom kroku	Odstranění značek	Analýza digitálního obrazu	Výhody	Nevýhody	Literatura
Chromogenní značení								
MICSSS	NA	10	NE	Odstranění substrátu AEC organickými rozpouštědly (EtOH řada s HCl)	Nespecifikováno	Nízké náklady, nízké riziko sférických překážek	Časová náročnost, nízká multiplexita, pravděpodobný vznik tkáňových artefaktů	(18,19)
SIMPLE	NA	12	NE	Odstranění substrátu AEC 70% EtOH a protilátky $KMnO_4$	Nespecifikováno	Nízké náklady, možnost značení primární protilátky stejného druhu	Nízká multiplexita, pravděpodobný vznik tkáňových artefaktů	(7,26)
IF značení								
MELC (TIS™)	ToposNomos GmbH	100	2	Fotovybělování	Toponome Imaging System	Vysoká multiplexita	Náklady, zobrazení pouze konkrétního zorného pole	(39)
CycIF	NA	60	2–3	Inaktivace H_2O_2 a světlem	Nespecifikováno	Vysoká multiplexita a používání běžných činidel a přístrojů	Časová náročnost, možnost poškození tkáně po několikanásobném značení	(7,33,35)
MICS	Miltenyi Biotec	100	3	NA/ fotovybělování/ uvolňování fluorochromu	MACS® iQ View	Vysoká multiplexita, plně automatizovaný systém, vysoká reprodukovatelnost, možnost simultánní detekce RNA i protilátek na jednom preparátu	Vyšší náklady, časová náročnost, možnost použití pouze zabudovaného softwaru pro analýzu dat	(36,37,40)
COMET™	Lunaphore Technologies	40	2	Tlumící roztok	HORIZON™/ Nespecifikováno	Plně automatizovaný systém, možnost simultánní detekce RNA i protilátek na jednom preparátu, snadná optimalizace, otevřený systém, rychlé cykly díky mikrofluidním čipům	Nízká kapacita paralelního barvení (max. 4 vzorky/cyklus)	(38,41,42)

Tabulka č. 2. Srovnání vybraných metod multiplexní analýzy FFPE tkáňových vzorků na bázi TSA, hmotnostní cytometrie a DNA kódování.

Název metody	Prodejce	Multiplexita	Barvení více protilátek v jednom kroku	Odstranění značek	Detekce obrazu	Analýza digitálního obrazu	Výhody	Nevýhody	Literatura
Tyramidová amplifikace signálu (TSA)									
IF i chromogenní TSA	Akoya Biosciences	9	NE	Odstranění protilátek prostřednictvím mikrovlnné inkubace	Phenolmager® HT 2.0	inForm® spolu s/bez phenoptRReports nebo jakýkoliv jiný	Bez zkřížené zviřecí reaktivity biomarkerů, automatizovaný protokol, amplifikace signálu	Nízká multiplexita	(2,28, 45,47, 63-65)
IF i chromogenní TSA	Roche (Discovery Ultra)	7	NE	Deaktivace teplem	Světelný či fluorescenční mikroskop/ skener	Nespecifikováno	Bez zkřížené zviřecí reaktivity biomarkerů, automatizovaný protokol, amplifikace signálu	Nízká multiplexita, pouze pro vědecké účely	(2,8, 66)
DNA kódování									
DEI	NA	8	8	NA/Odstranění značek strippingovým puřrem	Fluorescenční či konfokální mikroskop/ skener	Nespecifikováno	Rychlejší barvení, použití pro většinu mikroskopických platforem	Nízká multiplexita, absence zesílení signálu	(7,52)
CODEX	Akoya Biosciences	100	60	NA/ Odstranění značek puřrem s nízkou iontovou silou	PhenoCycler®- Fusion 2.0	Akoya software nebo jakýkoliv jiný	Vysoká multiplexita, možnost zobrazení konvenční fluorescenční mikroskopii	Delší skenování a absence zesílení signálu	(7,48, 49,67)
Immuno-SABER	NA	10	10	NA/Reverzibilní hybridizace	Fluorescenční mikroskop/ skener	Nespecifikováno	Vysoká citlivost a několiknásobné zesílení signálu	Omezená tloušťka vzorku	(7,50, 53)
DSP	NanoString	570	570	UV ozářením se odštěpí UV-indexované oligonukleotidy	GeoMx™ s využitím nCounter®/ NGS platformy	GeoMx® DSP data center	Současné měření všech markerů a vysoká multiplexita	Manuální vybírání ROI, žádná data o expresi jednotlivých buněk, bez možnosti rekonstrukce snímku	(3,7, 56,58, 68, 69)
InSituPlex®	Ultivue	12	12	NA	Fluorescenční mikroskop/ skener	Nespecifikováno	Přívětivý signál u antigenu s nízkou expresí, kratší pracovní postup, nižší náklady	Nízká multiplexita, prostorové rozlišení	(7,8,13, 54,70)
SignalStar™	Cell Signaling Technology	8	8	Chemické odstranění značek	Fluorescenční či konfokální mikroskop/ skener	Nespecifikováno	Velmi rychlé barvení, ale také i optimalizace a validace panelů, citlivé na nízké epitopy, kompatibilní s barvicím automatem BOND RX (Leica Biosystems)	Nízká multiplexita, závislost na výrobcem dodaných panelech	(55, 71)
Hmotnostní cytometrie									
IMC	Standard BioTools	40	40	NA	Hyperion™ Imaging Systém	MCD™ Viewer, histoCAT	Vysoká multiplexita, bez autofluorescence	Vysoké náklady, nižší rychlost snímání obrazu	(61, 72-74)
MIBI	Ionpath	100	100	NA	MIBIScope™ 3.0	MIBItracker nebo jakýkoliv jiný	Vysoká multiplexita, vysoce citlivá detekce, předdefinované pracovní postupy a intuitivní design softwaru	Vysoké náklady, nižší dostupnost kvůli komplexnosti zařízení	(7,8, 62)

Simultánní značení s jednorázovým snímáním

Simultánní aplikace všech protilátek zvoleného panelu s následným jednorázovým snímáním značené tkáně významně redukuje časovou náročnost a zároveň usnadňuje digitální analýzu (17,37). Jednou z těchto pokročilých platforem je systém Orion™ od společnosti RareCyte, jenž významně rozšiřuje možnosti mIHC analýzy FFPE tkání prostřednictvím simultánního multispektrálního snímání až ve 20 fluorescenčních kanálech (včetně detekce DNA a autofluorescenčních signálů). Platforma umožňuje současnou detekci všech biomarkerů v rámci jednoho barvicího cyklu, což přispívá k detailní fenotypizaci imunitních a nádorových populací, identifikaci strukturálních komponent mikroprostředí a analýze terapeutických mechanismů (Obr. 1, 3). Významnou výhodou této technologie je také schopnost kombinovaného zobrazení IF signálů a barvení H&E na témž řezu, čímž lze dosáhnout detailní analýzy proteinové exprese v kontextu buněčné morfologie a tkáňové architektury. Důležitým aspektem z pohledu klinického výzkumu a diagnostické praxe je rovněž možnost celoplošného snímání tkáně, které je nezbytné jak pro dosažení statisticky robustních závěrů, tak pro naplnění regulačních požadavků (17,37).

Digitální obrazová analýza

Současné softwarové nástroje pro analýzu digitálních histopatologických obrazů většinou sdílejí podobné pracovní postupy. Klíčovým prvkem je využití referenčních bodů k identifikaci tkáňových struktur, což umožňuje segmentaci a klasifikaci obrazu i následnou detekci proteinů v různých tkáňových kompartmentech (75). Kvantifikace morfologie a exprese biomarkerů je zásadní pro přesnou klasifikaci tkání a buněk, které se dále hodnotí podle atributů specifických pro jednotlivé buňky. Buňky jsou následně klasifikovány jako pozitivní nebo negativní vůči jednotlivým markerům prostřednictvím binárních schémat (76).

Algoritmy strojového učení a automatizované modely hlubokého učení výrazně usnadňují analýzu velkých datových souborů, zejména pokud jsou schopny se adaptovat na tkáňovou heterogenitu (56,75,77). Nicméně jejich výkon může být nekonzistentní napříč různými snímky, pokud jsou použity pevně nastavené vstupní parametry, což představuje překážku pro zajištění robustní analýzy (76). Z tohoto důvodu se klade důraz na vytváření rozsáhlých tréninkových souborů obsahujících kvalitně anotovaná data. Avšak soubory dat obsahující anotace s důkladně ověřenou kvalitou jsou zřídka publikovány. Přesto se v poslední době objevují studie, které se cíleně snaží tuto mezeru v oblasti zpřístupnění kvalitních tréninkových dat vyplnit (78).

Standardní pracovní postup pro multiplexní analýzu zahrnuje segmentaci tkáně a buněk, fenotypizaci a export dat pro další zpracování. Tkáňová segmentace je jedním z klíčových kroků analýzy digitálních obrazů, jejímž cílem je rozdělit obraz do biologicky významných kompartmentů, jako je nádor, stroma, cévy či jiné histomorfologické oblasti. Pro úspěšnou segmentaci je zásadní poskytování reprezentativních příkladů jednotlivých kategorií, přičemž kvalita těchto tréninkových oblastí přímo ovlivňuje výslednou přesnost algoritmu. Také je důležité eliminovat rušivé prvky, konkrétně artefakty barvení a zpracování tkáně nebo nekrózy. Tímto procesem se optimalizuje výkon softwaru za současné časové úspory (76). Pro segmentaci buněk se využívá kontrastního barvení, které umožňuje přesnou identifikaci a fenotypizaci jednotlivých buněk na základě lokalizace exprese v jejich specifických kompartmentech (tj. jádro, cytoplazma nebo membrána). Pro zlepšení přesnosti segmentace je vhodné zařadit jeden či více univerzálních markerů (např. cytokeratin, CD3, CD68) (79). Poté pomocí kombinace exprese jednotlivých nebo společných proteinů je možné definovat buněčné fenotypy a jejich funkční vlastnosti (76,79).

Jedním ze softwarů, který umožňuje analýzu digitálních obrazů je „open-source“ QuPath, jenž je navržený primárně pro zpracování a analýzu patologických snímků ve vysokém rozlišení. Nabízí široké možnosti anotace, segmentace a kvantifikace tkání, buněk a proteinů. Díky podpoře skriptování je vysoce přizpůsobitelný pro různé aplikace v patologii i výzkumu (80). ImageJ/Fiji je další univerzální nástroj s širokým spektrem funkcí pro základní, ale i pokročilé zpracování a kvantifikaci obrazů, zejména díky otevřené struktuře umožňující integraci „plug-ins“. Oproti QuPath však vyžaduje větší míru manuálního zásahu při analýze (81–83). QuPath navíc umožňuje snadný export obrazových dat do ImageJ/Fiji, což usnadňuje kombinované využití těchto nástrojů v rámci analýzy biologických snímků (80). Histocat (tzv. Histology Topography Cytometry Analysis Toolbox) je specificky navržen pro prostorovou analýzu a fenotypizaci buněk z hmotnostní cytometrie, což z něj činí ideální nástroj pro zkoumání komplexních buněčných interakcí, avšak jeho využití mimo hmotnostní cytometrii je omezenější ve srovnání s výše zmiňovanými platformami (80,83,84). Dalším „open source“ přístupem je MCMICRO (tzv. Multiple Choice MICROscopy), který se zaměřuje na převod vícekanálových celoplošných snímků na jednobuněčná data (85,86). Kromě „open-source“ programů pro digitální patologii jsou k dispozici i komerční platformy, často dodávané s dedikovaným přístrojem, např. HALO (87,88), Definiens Tissue Studio (89), Aiforia (90), uPath aj. (91) (Tab. 3).

Perspektiva multiplexní imunohistochemie v klinických laboratořích

Metody mIHC představují slibný nástroj pro klinickou diagnostiku, hodnocení agresivity onemocnění i výběr terapie, avšak zatím zůstávají v raných fázích implementace (Obr. 2). I přes očekávaný nárůst významu mIHC v budoucnosti je nepravděpodobné, že by nahradila tradiční IHC v krátkodobém horizontu (2).

V rutinní patologické praxi se již řadu let využívají různé formy duálního IHC značení. Zpravidla jsou založeny na vizualizaci běžně dostupnými chromogeny DAB a AEC. Mnohé komerčně dostupné kombinace jsou již zavedeny jako IVD. Typickým příkladem je současná detekce p63 a AMACR, která se využívá při diagnostice nejednoznačných případů karcinomu prostaty (98,99). Obdobně se hodnotí exprese lehkých řetězců kappa a lambda k posouzení klonality při diagnostice mnohočetného myelomu. V diferenciálně-diagnostické rozvaze karcinomů dutiny břišní se často uplatňuje kombinace markerů CDX2 a CK7, zatímco v případech potvrzení diagnózy plicního adenokarcinomu se běžně používá souběžná detekce TTF1 a napsinu A. Rovněž u hematologických malignit je běžné paralelní značení jako CD4/CD8, Bcl-2/Bcl-6, CD23/CD5, PAX5/CD5 nebo cyklin D1/CD79a aj. (100). V některých případech se využívají koktejly protilátek v kombinaci s dalším značením, například směs melanomových markerů detekovaná jedním chromogenem a proliferační marker Ki-67 druhým. Při použití pouze dvou chromogenů lze rovněž využít rozdíly v subcelulární lokalizaci některých proteinů. Příkladem jsou v cytoplasmě obsažené cytokeratiny, které mohou být vizualizovány stejným chromogenem jako zpravidla jaderný transkripční faktor p63, a to při zachování dostatečné rozlišitelnosti obou signálů. Díky pečlivé rozvaze založené na detailní znalosti antigenů je tak možné pomocí dvou chromogenů analyzovat expresi tří, ba dokonce čtyř proteinů. V žádném z těchto případů ovšem nelze mluvit o skutečné multiplexní značení (2).

V oblasti výzkumu je nadále preferovanou mIHC metodou IF značení kvůli své schopnosti detekovat vzácné buněčné populace nebo kolokalizace proteinů. Navzdory těmto výhodám je obtížné tuto metodu využívat rutinně, zejména kvůli reprodukovatelnosti signálů, a to i při zavedení automatizovaných postupů barvení (11). Pro IF multiplexní analýzu je nezbytná investice do

Tabulka č. 3. Přehled vybraných analytických softwarů určených pro zpracování digitálních obrazů v oblasti výzkumu a klinické diagnostiky.

Software	Vývojář	Open-source	Skriptování	Strojové učení	Použití	IVD	Výhody	Nevýhody	Literatura
QuPath	Peter Bankhead a kolektiv	ANO	ANO	ANO	Pouze pro vědecké účely	NE	Podpora strojového učení, přizpůsobitelné skriptování, kompatibilní pro většinu mlHC platform, schopnost zpracovávat obrazová data celých preparátů, vestavěný software pro segmentaci buněk, zdarma	Vyžaduje základní znalosti skriptování, absence přímé integrace pro klinické IVD aplikace	(8,80,92)
ImageJ/Fiji	National Institutes of Health	ANO	ANO	Základní verze NE, ale lze tyto funkce přidat: DeeplImageJ, Trainable WEKA, CellPose aj.	Pouze pro vědecké účely	NE	Rozsáhlé možnosti úprav obrazu, mnoho pluginů (př. IHC profiler, Andy's algorithms aj.), zdarma	Složitější pro nové uživatele	(83, 93)
histoCAT	Anton Rau a Bernd Bodenmiller	ANO	NE	ANO	Pouze pro vědecké účely	NE	Doporučený software pro IMC, zdarma	Je nutné propojení s jiným softwarem pro segmentaci (např. CellProfiler)	(8,84, 94)
HALO	Indica Labs	NE	ANO	ANO	Klinické použití i vědecké účely	ANO	Intuitivní uživatelské rozhraní, neomezená IT i vědecká podpora	Cena, často vyžaduje manuální anotaci	(76,88,95)
Aiforia	Aiforia Technologies	Ne	ANO	ANO	Klinické použití (některé verze), vědecké účely	ANO	Přizpůsobení softwaru na míru	Cena	(90,96)
uPath	Roche	NE	ANO	ANO	Klinické použití	ANO	Klinicky validované	Cena, omezená univerzálnost pro jiné než Roche skenery	(92,97)

specializovaného vybavení, zejména do multispektrálních skenerů. Navíc implementace těchto technologií rovněž klade nároky na dodatečné vzdělávání patologů i laboratorního personálu. Kromě toho by tak vzrůstala časová i finanční náročnost spojená s validací testů v porovnání s konvenční IHC (2). Navzdory těmto výzvám se někteří výzkumníci snaží být o krok blíže k integraci mlHC do rutinních klinických laboratoří. Například byla zkoumána reprodukovatelnost a klinická validace panelu šesti biomarkerů PD-L1, PD-1, CD8, CD68, FOXP3 a CK na vzorcích tonzily, karcinomu prsu a nemalobuněčného karcinomu plic napříč šesti institucemi. Plná validace tohoto panelu by mohla otevřít cestu i pro jeho klinické využití (101).

I přes četné výhody nových sofistikovaných přístupů hmotnostní cytometrie a DNA kódování pro multiplexování, které umožňují detekci více než 100 biomarkerů na jediném vzorku, jsou zde značné překážky pro klinické použití. A to zejména časová náročnost, vybavení a náklady na analýzu. Heterogenita nádorů navíc komplikuje studium charakteristik nádorového mikroprostředí, protože většina těchto moderních metod analyzuje pouze část tkáně a neumožňuje celoplošnou analýzu. Zároveň se pro klinické zkoumání preferují techniky, jež nabízí rychlou, spolehlivou a nákladově efektivní analýzu heterogenní tkáně. Z těchto důvodů neustále vznikají nové techniky mlHC, jež se snaží zkrátit čas potřebný k analýze (např. Orion™ od Rarrecyte) (17,37,102).

Dle dostupných informací nejsou mlHC pro analýzu mnohočetných markerů schválené v režimu IVD ani Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA), ani Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Tyto metody proto nadále spadají do kategorie interně vyvinutých laboratorních testů. V důsledku toho jsou klinické laboratoře při jejich zavádění povinny validovat klíčové parametry, jako jsou přesnost, preciznost, kalibrační a kontrolní postupy, měřicí rozsah a referenční rozmezí. Veškeré tyto charakteristiky musí být řádně zdokumentovány (2,103).

ZÁVĚR

Možnost simultánní detekce více epitopů umožňuje detailní charakterizaci fenotypu a funkčního stavu buněk v tkáňovém mikroprostředí, což překonává omezení konvenční IHC. Zatímco chromogenní mlHC zůstává vhodná pro nízký stupeň multiplexování, fluorescenční a hmotnostně spektrometrické metody umožňují analýzu rozsáhlých panelů biomarkerů. Pro zvýšení specifity značení a usnadnění kvantifikace signálu lze použít protilátky konjugované s DNA značkami. Dynamický vývoj těchto technologií neustále rozšiřuje možnosti prostorové analýzy a přispívá ke zdokonalování stávajících přístupů. Nicméně jejich implementace do klinických laboratoří naráží na řadu výzev,

včetně nutnosti validace protilátek, standardizace obrazové analýzy a regulačních omezení souvisejících s interně vyvinutými laboratorními testy. Kromě toho je klíčové posouzení ekonomické stránky těchto metod v rutinní diagnostice. S postupující automatizací a digitalizací patologických procesů lze očekávat postupné začlenění mIHC do klinické praxe, což by mohlo významně přispět k přesnější stratifikaci pacientů a podpořit tak rozvoj personalizované medicíny.

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno MZ ČR - NU21-03-00421.

PROHLÁŠENÍ

Ústav klinické a molekulární patologie má v testovacím režimu od firmy Accela zapůjčený systém Orion Rarecyte. Autoři prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

LITERATURA

1. **World Health Organization.** Guide for establishing a pathology laboratory in the context of cancer control. Geneva, CH: World Health Organization; 2019. ISBN: 9789241516938.
2. **Harms PW, Frankel TL, Mouta M, et al.** Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. *Mod Pathol* 2023; 36(7): 100197.
3. **Taube JM, Akturk G, Angelo M, et al.** The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *J Immunother Cancer* 2020; 8(1): e000155.
4. **Leong AS, Leong TY.** Standardization in Immunohistology. In: **Al-Mulla F**, eds. *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Methods and Protocols* (1th ed). Totowa, NJ: Humana Press, 2011; 724: 37–68.
5. **Sukswai N, Khoury JD.** Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malign Rep* 2019; 14(5): 368–375.
6. **Lewis TL, Roth KA.** Immunohistochemical Detection Methods. In: **McManus ML, Mitchell NR**, eds. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* (1th ed). Amsterdam NL: Elsevier, 2014; 3829–3840.
7. **Sheng W, Zhang C, Mohiuddin TM, et al.** Multiplex Immunofluorescence: A Powerful Tool in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2023; 24(4): 3086.
8. **Chang W, Tan C, Nerurkar SN, et al.** Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun (Lond)* 2020; 40(4): 135–53.
9. **Im K, Mareninov S, Diaz MFP, et al.** An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol* 2019; 1897: 299–311.
10. **Hernandez S, Rojas F, Laberiano C, et al.** Multiplex Immunofluorescence Tyramide Signal Amplification for Immune Cell Profiling of Paraffin-Embedded Tumor Tissues. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 667067.
11. **Hofman P, Badoual C, Henderson F, et al.** Multiplexed Immunohistochemistry for Molecular and Immune Profiling in Lung Cancer—Just About Ready for Prime-Time? *Cancers (Basel)* 2019; 11(3): 283.
12. **Pugh M, Akarka AU, Hunter K, et al.** Multiplex immunohistochemistry in lymphoma pathology: a research tool for study of the immune microenvironment. *Diagnostic Histopathol* 2020; 26(9): 407–420.
13. **Wharton KA, Wood D, Manesse M, et al.** Tissue Multiplex Analyte Detection in Anatomic Pathology – Pathways to Clinical Implementation. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 672531.
14. **Lara H, Li Z, Abels E et al.** Quantitative Image Analysis for Tissue Biomarker Use: A White Paper from the Digital Pathology Association. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2021; 29(7): 479–493.
15. **Stack EC, Wang C, Roman KA, et al.** Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* 2014; 70(1): 46–58.
16. **Levenson RM, Borowsky AD, Angelo M.** Immunohistochemistry and mass spectrometry for highly multiplexed cellular molecular imaging. *Lab Invest* 2015; 95(4): 397–405.
17. **Lin JR, Chen YA, Campton D et al.** High-plex immunofluorescence imaging and traditional histology of the same tissue section for discovering image-based biomarkers. *Nat Cancer* 2023; 4(7): 1036–52.
18. **Remark R, Merghoub T, Grabe N et al.** In-depth tissue profiling using multiplexed immunohistochemical consecutive staining on single slide. *Sci Immunol* 2016; 1(1): aaf6925.
19. **Akturk G, Sweeney R, Remark R, et al.** Multiplexed Immunohistochemical Consecutive Staining on Single Slide (MICSSS): Multiplexed Chromogenic IHC Assay for High-Dimensional Tissue Analysis. *Methods Mol Biol* 2020; 2055: 497–519.
20. **Chen T, Srinivas C.** Group sparsity model for stain unmixing in brightfield multiplex immunohistochemistry images. *Comput Med Imaging Graph* 2015; 46: 30–39.
21. **Zrazhevskiy P, Gao X.** Quantum dot imaging platform for single-cell molecular profiling. *Nat Commun* 2013; 4: 1619.
22. **Su T, Wang S, Huang S et al.** Multiplex immunohistochemistry and high-throughput image analysis for evaluation of spatial tumor immune cell markers in human breast cancer. *Cancer Biomark* 2022; 35(2): 193–206.
23. **Muñoz-Castro C, Noori A, Magdamo CG et al.** Cyclic multiplex fluorescent immunohistochemistry and machine learning reveal distinct states of astrocytes and microglia in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2022; 19(1): 30.
24. **Viratham Pulsawatdi A, Craig SG, Bingham V, et al.** A robust multiplex immunofluorescence and digital pathology workflow for the characterisation of the tumour immune microenvironment. *Mol Oncol* 2020; 14(10): 2384–2402.
25. **Patel SS, Rodig SJ.** Overview of Tissue Imaging Methods. In: **Thurin M, Cesano A, Marincola F**, eds. *Biomarkers for Immunotherapy of Cancer: Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana; 2020; 2055: 455–465.
26. **Glass G, Papin JA MJ.** SIMPLE: A Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing Method. *J Histochem Cytochem* 2009; 57(10): 899–905.
27. **Berndt U, Philipsen L, Bartsch S, et al.** Research Comparative Multi-Epitope-Ligand-Cartography reveals essential immunological alterations in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 117.
28. **Francisco-Cruz A, Parra ER, Tetzlaff MT, et al.** Multiplex Immunofluorescence Assays. In: **Thurin M, Cesano A, Marincola F**, eds. *Biomarkers for Immunotherapy of Cancer: Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana; 2020; 2055: 467–495.
29. **Schubert W.** Topological Proteomics, Toponomics, MELK-Technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003; 83: 189–209.
30. **Schubert W, Bonnekoh B, Pommer AJ et al.** Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol* 2006; 24(10): 1270–1278.
31. **Dixon AR, Bathany C, Tsuei M, et al.** Recent developments in multiplexing techniques for immunohistochemistry. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(9): 1171–1186.
32. **Schubert W, Gieseler A, Krusche A, et al.** Next-generation biomarkers based on 100-parameter functional super-resolution microscopy TIS. *N Biotechnol* 2012; 29(5): 599–610.
33. **Lin JR, Fallahi-Sichani M, Chen JY, et al.** Cyclic Immunofluorescence (CycIF), A Highly Multiplexed Method for Single-cell Imaging. *Curr Protoc Chem Biol* 2017; 8(4): 251–264.
34. **Gerdes MJ, Sevinsky CJ, Sood A et al.** Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(29): 11982–11987.
35. **Lin JR, Izar B, Wang S et al.** Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *eLife* 2018; 7: e31657.
36. **Kinkhabwala A, Herbel C, Pankratz J et al.** MACSima imaging cyclic staining (MICS) technology reveals combinatorial target pairs for CAR T cell treatment of solid tumors. *Sci Rep* 2022; 12(1): 19114.

37. **Aung TN, Bates KM, Rimm DL.** High-Plex Assessment of Biomarkers in Tumors. *Mod Pathol* 2024; 37(3): 100425.
38. **Rivest F, Eroglu D, Pelz B, et al.** Fully automated sequential immunofluorescence (seqIF) for hyperplex spatial proteomics. *Sci Rep* 2023; 13(1): 1–14.
39. **ToposNomos.** ToposNomos Spatial Biology. *Internet*. Dostupné z: <https://www.toposnomos.com/>. Přístup dne 26.4.2025
40. **Miltenyi Biotec.** MACSima™ Imaging Cyclic Staining (MICS) Technology. *Internet*. Dostupné z: <https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/macs-imaging-and-spatial-biology/macsima-platform/mics-technology.html>. Přístup dne 26.4.2025.
41. **Lunaphore Technologies.** Horizon™. *Internet*. Dostupné z <https://lunaphore.com/products/horizon/>. Přístup dne 26.6.2025
42. **Lunaphore Technologies.** COMET™. *Internet*. Dostupné z <https://lunaphore.com/products/comet/>. Přístup dne 26.6.2025
43. **Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, et al.** Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol Methods* 1989; 125(1–2): 279–285.
44. **Bobrow MN, Shaughnessy KJ, Litt G.** Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* 1991; 137(1): 103–112. d
45. **Faget L, Hnasko TS.** Tyramide Signal Amplification for Immunofluorescent Enhancement. In: **Hnasko R**, eds. *ELISA: Methods and Protocols*. New York, NY: Humana; 2015; 1318: 161–172.
46. **Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH et al.** PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2015; 515(7528): 568–571.
47. **Hoyt CC.** Multiplex Immunofluorescence and Multispectral Imaging: Forming the Basis of a Clinical Test Platform for Immuno-Oncology. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 674747.
48. **Goltsev Y, Samusik N, Kennedy-Darling J, et al.** Deep Profiling of Mouse Splenic Architecture with CODEX Multiplexed Imaging. *Cell* 2018; 174(4): 968–981.e15.
49. **Black S, Phillips D, Hickey JW, et al.** CODEX multiplexed tissue imaging with DNA-conjugated antibodies. *Nat Protoc* 2022; 16(8): 3802–3835.
50. **Wang Y, Liu X, Zeng Y, et al.** Multiplexed in situ protein imaging using DNA-barcoded antibodies with extended hybridization chain reactions. *Nucleic Acids Res* 2024; 52(15): e71.
51. **Choi J, Love KR, Gong Y, et al.** Immuno-Hybridization Chain Reaction for Enhancing Detection of Individual Cytokine-Secreting Human Peripheral Mononuclear Cells. *Anal Chem* 2011; 83(17): 6890–6895.
52. **Wang Y, Woehrstein JB, Donoghue N, et al.** Rapid Sequential in Situ Multiplexing with DNA Exchange Imaging in Neuronal Cells and Tissues. *Nano Lett* 2017; 17(10): 6131–6139.
53. **Saka SK, Wang Y, Kishi JY, et al.** Immuno-SABER enables highly multiplexed and amplified protein imaging in tissues. *Nat Biotechnol* 2019; 37(9): 1080–1090.
54. **Manesse M, Patel KK, Bobrow M, et al.** The InSituPlex® Staining Method for Multiplexed Immunofluorescence Cell Phenotyping and Spatial Profiling of Tumor FFPE Samples In: **Thurin M, Cesano A, Marincola F**, eds. *Biomarkers for Immunotherapy of Cancer: Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana; 2020; 2055: 585–592.
55. **Cell Signaling Technology.** Spatial Profiling with SignalStar™ Multiplex IHC. *Internet*. Dostupné z <https://www.cellsignal.com/applications/signalstar-multiplex-ihc-overview>. Přístup dne 13.6.2025
56. **Merritt CR, Ong GT, Church SE, et al.** Multiplex digital spatial profiling of proteins and RNA in fixed tissue. *Nat Biotechnol* 2020; 38(5): 586–99.
57. **Einhaus J, Rochwarger A, Mattern S, et al.** High-multiplex tissue imaging in routine pathology—are we there yet?. *Virchows Arch* 2023; 482(5): 801–812.
58. **Eyers M, Irlam J, Marshall G, et al.** Digital spatial profiling of the microenvironment of muscle invasive bladder cancer. *Commun Biol* 2024; 7(1): 737.
59. **Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, et al.** Mass Cytometry: Technique for Real Time Single Cell Multitarget Immunoassay Based on Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2009; 81(16): 6813–6822.
60. **Bjornson ZB, Nolan GP FW.** Single Cell Mass Cytometry for Analysis of Immune System Functional States. *Curr Opin Immunol* 2013; 25(4): 484–494.
61. **Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, et al.** Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 2014; 11(4): 417–422.
62. **Angelo M, Bendall SC, Finck R, et al.** Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med* 2014; 20(4): 436–442.
63. **Akoya Biosciences.** Phenolmager HT. *Internet*. Dostupné z: <https://www.akoyabio.com/phenoimager/instruments/phenoimager-ht/>. Přístup dne 28.4.2025.
64. **Akoya Biosciences.** inForm Tissue Analysis Software. *Internet*. Dostupné z: <https://www.akoyabio.com/phenoimager/inform-tissue-finder/>. Přístup dne 28.4.2025.
65. **HPST.** Phenolmager HT – Akoya Biosciences. *Internet*. Dostupné z: <https://hpst.cz/bunecna-biologie-mikroskopie/spatial-omics-akoya-biosciences/phenoimager-ht#>. Přístup dne 28.4.2025.
66. **Roche.** Discovery Ultra. *Internet*. Dostupné z: <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/product-category/immunohistochemistry-ihc/-discovery-ultra.html>. Přístup dne 28.4.2025.
67. **Akoya Biosciences.** PhenoCycler. *Internet*. Dostupné z: <https://www.akoyabio.com/phenoicycler/>. Přístup dne 28.4.2025.
68. **NanoString.** GeoMx® Digital Spatial Profiler. *Internet*. Dostupné z: <https://nanosttring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/>. Přístup dne 28.4.2025.
69. **NanoString.** nCounter® Analysis Systems for Biomarker Validation and Biomarker Development. *Internet*. Dostupné z: <https://nanosttring.com/products/ncounter-analysis-system/ncounter-systems-overview/>. Přístup dne 28.4.2025.
70. **Ultivue.** InSituPlex® technology. *Internet*. Dostupné z <https://ultivue.com/insituplex-technology/>. Přístup dne 13.6.2025
71. **Cell Signaling Technology.** SignalStar™ Multiplex Immunohistochemistry Assay Manual. *Internet*. Dostupné z <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protocols/signalstar-multiplex-ihc-assay-manual>. Přístup dne 13.6.2025
72. **Standard BioTools.** Imaging Mass Cytometry™ (IMC™). *Internet*. Dostupné z: <https://www.standardbio.com/products/technologies/imaging-mass-cytometry#workflow-anchor>. Přístup dne 28.4.2025.
73. **Standard BioTools.** Hyperion XTi Imaging System. *Internet*. Dostupné z: <https://www.standardbio.com/support/instrument-support/hyperion-xti-support>. Přístup dne 28.4.2025.
74. **Immune Dynamics.** Spectre Spatial Visualisation. *Internet*. Dostupné z: <https://immunedynamics.io/spectre/spatial/visualisation/>. Přístup dne 28.4.2025.
75. **Moen E, Bannon D, Kudo T, et al.** Deep learning for cellular image analysis. *Nat Methods* 2019; 16(12): 1233–1246.
76. **Rojas F, Hernandez S, Lazcano R, et al.** Multiplex Immunofluorescence and the Digital Image Analysis Workflow for Evaluation of the Tumor Immune Environment in Translational Research. *Front Oncol* 2022; 12: 889886.
77. **Zeng W.** Image data augmentation techniques based on deep learning: A survey. *Math Biosci Eng.* 2024; 21(6): 6190–6224.
78. **Aleynick N, Li Y, Xie Y, et al.** Cross-platform dataset of multiplex fluorescent cellular object image annotations. *Sci Data* 2023; 10(1): 193.
79. **Parra ER, Jiang M, Solis L, et al.** Procedural Requirements and Recommendations for Multiplex Immunofluorescence Tyramide Signal Amplification Assays to Support Translational Oncology Studies. *Cancers (Basel)* 2020; 12(2): 255.
80. **Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al.** QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017; 7(1): 16878.
81. **Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, et al.** Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One* 2014; 9(5): e96801.
82. **Marée R.** Open Practices and Resources for Collaborative Digital Pathology. *Front Med* 2019; 6: 255.
83. **Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 671–675.
84. **Schapiro D, Jackson HW, Raghuraman S, et al.** histoCAT: analysis of cell phenotypes and interactions in multiplex image cytometry data. *Nat Methods* 2017; 14(9): 873–876.
85. **Schapiro D, Sokolov A, Yapp C, et al.** MC-MICRO: a scalable, modular image-processing pipeline for multiplexed tissue imaging. *Nat Methods* 2022; 19(3): 311–315.
86. **Wan G, Maliga Z, Yan B, et al.** SpatialCells: automated profiling of tumor microenvironments with spatially resolved multiplexed single-cell data. *Brief Bioinform* 2024; 25(3): bbae189.

87. **Mascaux C, Angelova M, Vasaturo A, et al.** Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis. *Nature* 2019; 571(7766): 570–575.
88. **Giraldo NA, Nguyen P, Engle EL, et al.** Multidimensional, quantitative assessment of PD-1/PD-L1 expression in patients with Merkel cell carcinoma and association with response to pembrolizumab. *J Immunother Cancer* 2018; 6(1): 99.
89. **Dawe M, Shi W, Liu TY, et al.** Reliability and Variability of Ki-67 Digital Image Analysis Methods for Clinical Diagnostics in Breast Cancer. *Lab Invest* 2024; 104(5): 100341.
90. **Flotte TJ, Derauf SA, Byrd RK, et al.** Democratizing Artificial Intelligence in Anatomic Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2025; 149(1): 55–59.
91. **Yoder A, Inge LJ, Chen CC, et al.** Computer-aided scoring of erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (HER2) gene amplification status in breast cancer. *J Pathol Inform* 2022; 13: 100116.
92. **Bankhead P.** QuPath User Documentation. *Internet*. Dostupné z: <https://qupath.readthedocs.io/en/stable/index.html>. Přístup dne 28.4.2025.
93. **National Institutes of Health.** ImageJ. *Internet*. Dostupné z: <https://imagej.net/imagej-wiki-static/Welcome>. Přístup dne 28.4.2025.
94. **Rau A, Bodenmiller B.** HistoCAT. *Internet*. Dostupné z <https://bodenmillergroup.github.io/histocat-web/#overview>. Přístup dne 28.4.2025.
95. **Indica Labs.** HALO – Quantitative Image Analysis for Pathology. *Internet*. Dostupné z <https://indicalab.com/halo/>. Přístup dne 28.4.2025.
96. **Aiforia Technologies.** Aiforia: AI – for image analysis. *Internet*. Dostupné z <https://www.aiforia.com/>. Přístup dne 28.4.2025.
97. **Roche.** uPath Image Analysis Algorithms. *Internet*. Dostupné z <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/other/upath-image-analysis-algorithms.html>. Přístup dne 28.4.2025.
98. **Singh V, Manu V, Malik A, et al.** Diagnostic utility of p63 and α -methyl acyl Co A racemase in resolving suspicious foci in prostatic needle biopsy and transurethral resection of prostate specimens. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(3): 686–692. doi: 10.4103/0973-1482.138194.
99. **Trpkov K, Bartczak-McKay J, Yilmaz A.** Usefulness of cytokeratin 5/6 and AMACR applied as double sequential immunostains for diagnostic assessment of problematic prostate specimens. *Am J Clin Pathol* 2009; 132(2): 211–307.
100. **Obiorah IE, Wang HW, Ma D, et al.** The Effectiveness of Dual-Staining Immunohistochemistry in the Detection of Mantle Cell Lymphoma in the Bone Marrow. *Am J Clin Pathol* 2022; 157(5): 709–717.
101. **Taube JM, Roman K, Engle EL, et al.** Multi-institutional TSA-amplified Multiplexed Immunofluorescence Reproducibility Evaluation (MITRE) Study. *J Immunother Cancer* 2021; 9(7): e002197.
102. **Kimura A, Tsujikawa T, Morimoto H, et al.** Rapid multiplex immunohistochemistry for characterizing tumor-immune microenvironment. *Heliyon* 2024; 10(13): e33830.
103. **Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL).** Metodické doporučení pro implementaci požadavků IVDR na prostředky vyráběné a používané pouze v rámci zdravotnického zařízení. Praha, CZ: SÚKL; 2024: 1–46.