

# Současné metody multiplexní imunohistochemie pro analýzu fixovaných tkáňových vzorků

Romana Hendrychová<sup>1</sup>, Kateřina Čížková<sup>2</sup>, Dominik Hraboš<sup>1</sup>, Jan Bouchal<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> 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 pokročilých digitálních analýz 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 eosinem (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.