

Juha Väyrynen, Sara Väyrynen, Hely Ollila-Raj, Teijo Pellinen ja Tuomas Mirtti

Immunohistokemialliset monivärjäykset kudostutkimuksessa: diagnostiikan arkipäivää ja tulevaisuutta

Immunohistokemiallisten monivärjäysten avulla saadaan määritetyksi samanaikaisesti useiden kohde-antigeenien ilmenemistä kudostäytteissä. Käytössä olevat menetelmät voidaan karkeasti jakaa valomikroskooppilla nähtäviä väriaineita hyödyntävään kromogeeniseen monivärjykseen ja fluoresoivia merkkeleimoja eli fluoroforeja hyödyntävään moniväriseen immunofluoresenssiin, joskin menetelmien välillä on päällekkäisyyttä. Usean antigeenin samanaikainen värjääminen mahdollistaa eri solutyypeille ominaisten antigeeniprofiilien tunnistamisen. Menetelmien avulla voidaan myös osoittaa tarkemmin eri solutyypin sijaintia ja keskinäisiä suhteita samassa kudostäytteessä. Immunohistokemiallisia kaksoisvärjäyksiä käytetään nykyään yleisesti diagnostiikan apuna, esimerkiksi eturauhassyövän diagnosoinnissa. Tulevaisuudessa monivärjäys- ja kuvaamistekniikoiden sekä tietokonepohjaisten kuva-analyysimenetelmien kehittyminen saattaa mahdollistaa entistä yksityiskohtaisempien kudospirteiden hyödyntämisen sairauksien diagnosoinnissa, ennusteen arvioinnissa ja hoitomuotojen valinnassa.

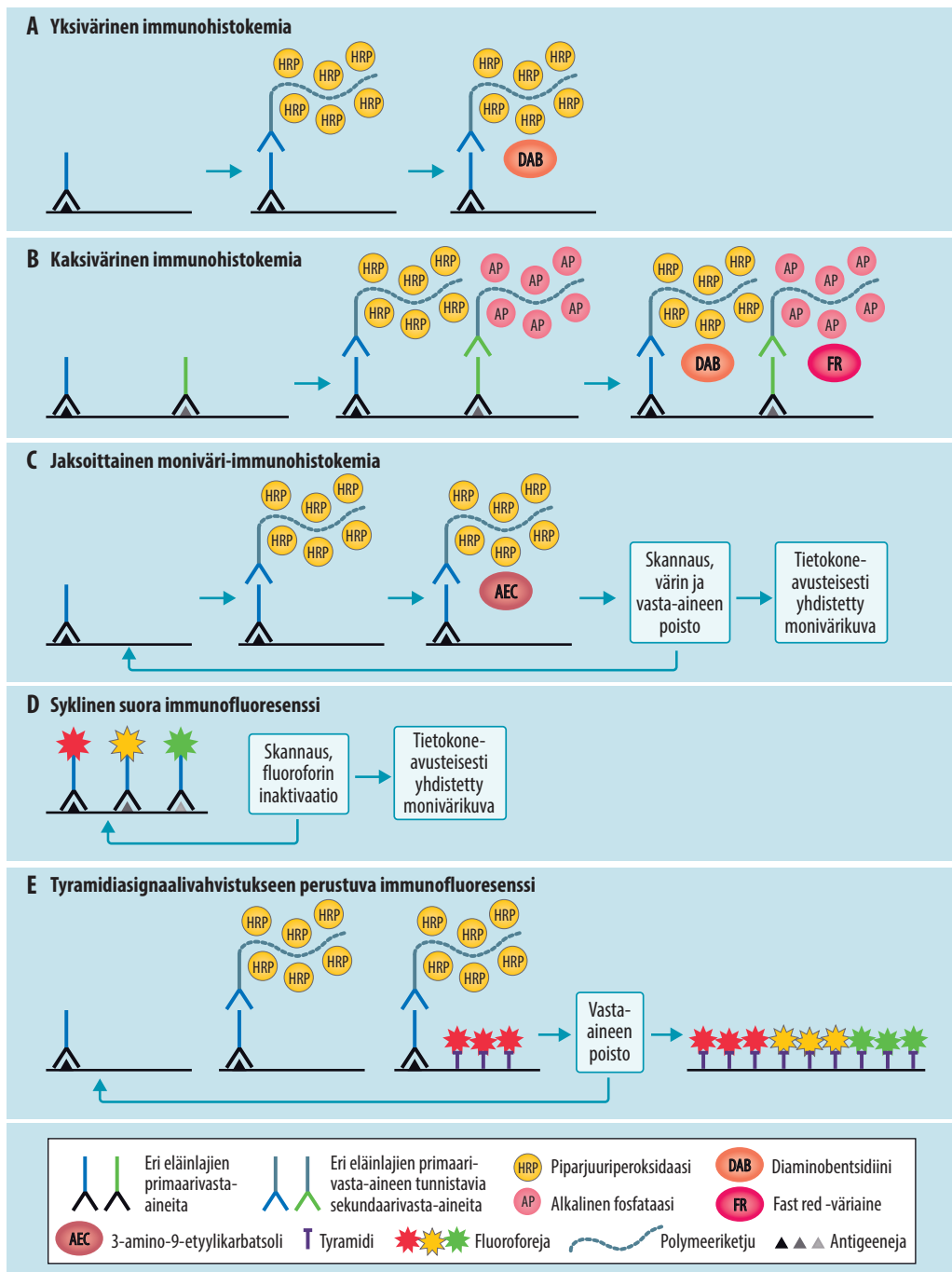
Immunohistokemia on keskeinen kudostutkimuksen menetelmä, jossa nimensä mukaisesti hyödynnetään vasta-aineita (immuno-) sekä kemiallisia reaktioita (kemialliset) solujen ilmentämien antigeenien tunnistamiseen kudoksissa (histo-) (1). Menetelmä kehitettiin alun perin 1900-luvun puolivälin aikoihin, mutta laajamittaiseen käyttöön se levisi vähitellen 1980-luvun lopulta lähtien kaupallisten vasta-aineiden sekä muiden tarvittavien reagenssien saatavuuden paranemisen myötä. Nykyään patologian laboratorioissa tehdään rutiinimaisesti immunohistokemiallisia värjäyksiä satoja kohdeantigeeneja kohtaan, ja värjäyksillä on tärkeä osa lukuisten pahan- ja hyvänlaatuisten tautien diagnosoinnissa sekä ennusteen ja soveltuvien hoitomuotojen määrittämisessä (1).

Immunohistokemian avulla on tavanomaisesti tutkittu yhden antigeenin ilmenemistä kerrallaan, mutta monen aallonpituusalueen menetelmät (multiplex imaging tai multispectral imaging) mahdollistavat useiden antigeenien limittäisen tai samanaikaisen analy-

soinnin yksittäisestä kudostäytteestä, ja menetelmiä onkin otettu yhä enemmän käyttöön viimeksi kuluneen vuosikymmenen aikana (2). Tässä katsauksessamme keskitymme pääasiassa proteiinien kudostutkimukseen monivärimenetelmillä, mistä voidaan myös käyttää termiä spatiaalinen proteomiikka. Erilaisista tekniikoista pyrimme tuomaan esille ne, joissa kudostäytettä ei hajoteta analyysia varten ja pystytään näin paikantamaan kohdemolekyylit solu- tai soluelintasolla.

Kudostutkimuksen monivärimenetelmiä

Suurin osa kliinisessä käytössä olevista immunohistokemian sovelluksista on niin kutsuttuja epäsuoria menetelmiä. Niissä väriainetta ei ole kiinnitetty suoraan kohdeantigeenin tunnistavaan vasta-aineeseen, vaan se syntyy näytelasille kemiallisen reaktion seurauksena. Yleisimmin tämä tapahtuu 3,3'-diaminobentsidiinin hapettua piparjuuriperoksidaasin



KUVA 1. Kaavakuvia proteiinien ilmenemisen osoittamisesta kudoksenäytteissä yksi- ja monivärimenetelmin. **A.** Yksivärisen immunohistokemian epäsuorassa menetelmässä voimistetaan värireaktiota hyödyntämällä sekundaariseen vasta-aineeseen liitettyä entsyymi-polymeeriketjua. **B.** Kaksivärinen immunohistokemia voidaan toteuttaa hyödyntämällä eri eläinlajeissa tuotettuja vasta-aineita ja eri entsyymeillä leimattuja sekundaarivasta-aineita. **C.** Jaksoittaisessa moniväri-immunohistokemiassa voidaan värjätä yksi antigeeni kerrallaan ja skannata näyte värjäyssykliden välissä. **D.** Fluoroforit voidaan kiinnittää suoraan vasta-aineisiin, ja muutama samanaikaisesti kiinnittynyt fluorofori voidaan erottaa toisistaan säteilyn aallonpituuden perusteella tavanomaisella fluoresenssiskannerilla. Menetelmää on mahdollista toistaa syklisesti. **E.** Immunofluoresenssiin voidaan liittää tyramidipohjaista signaalivahvistusta (TSA) heikommin ilmenevien antigeenien tunnistamiseksi. Tyramidifluoroforit reagoivat HRP-entsyymin kanssa ja kiinnittyvät tiukasti kohdekudokseen. Vastaavaa menetelmää voidaan hyödyntää myös kromogeenisissa värjäyksissä.

(HRP, horseradish peroxidase) vaikutuksesta, jolloin muodostuu näytteeseen kiinnittyvä ruskea reaktiotuote (KUVA 1) (3). HRP-entsyymit kiinnitetään primaarivasta-aineet tunnistavaan sekundaarivasta-aineeseen pitkäksi polymeeriketjuksi, mikä vahvistaa syntyvää värireaktiota ja mahdollistaa heikosti ilmenevien proteiinien tunnistamisen (3). Tämän tyyppisiä menetelmiä käytetään laajalti patologian laboratorioissa sairauksien diagnosoinnissa ja luokittelussa. Niiden avulla voidaan määrittää esimerkiksi useille lymfomille ominaiset tavanomaisesta poikkeavat antigeenien ilmentymisprofiilit (4).

Yleisimmin käytössä olevat moniväriset menetelmät ovat puolestaan kaksivärisiä ja perustuvat kahden eri eläimissä tuotetun vasta-aineen käyttöön. Nämä voidaan tunnistaa eri entsyymeillä leimatuilla sekundaarivasta-aineilla, mikä mahdollistaa kaksi toisistaan erotettavissa olevaa värillistä reaktiotuotetta (TAULUKKO 1). HRP:n ohella käytetään tyypillisimmin alkalista fosfaasia ja sen kanssa reagoivaa punaista väriainetta (5). Myös saman entsyymin kanssa reagoivien väriaineiden käyttäminen on mahdollista, mutta tällöin on hyödynnettävä jaksoittaista menetelmää, jossa näytteeseen lisätään yhtä vasta-ainetta ja väriainetta kerrallaan, ja aiemmissa värjäyskierroksissa sitoutuneet vasta-aineet ja entsyymipolymeerit irrotetaan näytteestä kierrosten välissä esimerkiksi kuumentamalla tai inaktivoidaan esimerkiksi happokäsittelyllä (5).

Nykyisin immunohistokemiaan on kaupallisesti saatavilla kymmenkunta erisävyistä väriainetta. Lisättäessä näytteeseen useampia väriaineita samanaikaisesti ongelmaksi muodostuu kuitenkin päällekkäisten värien erottamisen vaikeus: esimerkiksi punaisen ja vihreän värin yhdistelmää voi olla mahdotonta erottaa ruskeasta väristä. Värien erottelu voi toimia paremmin digitaalisesti, kun värjätty näyte ensin kuvataan tähän soveltuvalla multispektrikameralla (6).

Värien erottelun hankaluuden vuoksi etenkin tutkimuskäytössä on yhä enemmän sovellettu jaksoittaisia menetelmiä, joissa yksittäinen merkkiaine määritetään kerrallaan käyttämällä helposti poistettavissa olevia väriaineita, kuten 3-amino-9-etyylikarbatsolia (AEC) (7). Näyte

skannataan kunkin värjäyskierroksen jälkeen, ja saadut erilliset kuvat yhdistetään värjättyä sarjaa päätteeksi yhdeksi monikanavaiseksi kuvaksi, jossa värit on muunnettu digitaalisesti toisistaan eroaviksi. Tällä MICSSS (multiplexed immunohistochemical consecutive staining on single slide) -menetelmällä on mahdollista tunnistaa yksittäisestä leikkeestä periaatteessa rajaton määrä antigeeneja, käytännössä raja tulee kuitenkin vastaan kudoksen kestävyys mukaan (8). Menetelmä on myös varsin työläs ja sisältää lukuisia värjäys-skannaussyklejä.

Toinen keino useiden samoissa soluissa ilmenevien antigeenien samanaikaiseen määrittämiseen on primaari- tai sekundaarivasta-aineiden leimaaminen fluoroforeilla. Ne fluoresoivat eli absorboivat valoa ja emittoivat fotonit uudestaan tietyllä kullekin aineelle ominaisella aallonpituusalueella (2). Tavanomaisilla fluoresenssi-skannereilla voidaan usein tunnistaa samanaikaisesti kolmesta neljään eri fluoroforia. Eri-tyisesti tähän käyttötarkoitukseen kehitetyillä, kapeita aallonpituusalueita mittaavilla monivärikuvantamisjärjestelmillä voidaan puolestaan tunnistaa jopa kymmenen fluoroforia (9,10).

Useampien fluoresoivien signaalien erottelu voi kuitenkin käytännössä osoittautua vaativaksi eri kanavien aallonpituuksien pientenkin päällekkäisyyksien takia, jolloin yhden merkki-aineen signaalia voi vuotaa läpi toiselle kanavalle (signal bleed-through). Ongelman korjaamiseksi on kehitetty jaksoittaisia (syklisiä) menetelmiä, joissa muutama fluorofori tunnistetaan kerrallaan, näyte skannataan ja vasta-aineet sekä niihin kiinnittyneet fluoroforit irrotetaan kierrosten väleissä ja saadut kuvat yhdistetään toisiinsa tietokoneavusteisesti (11).

Fluoroforit voidaan kiinnittää suoraan primaarivasta-aineisiin, mutta menetelmä soveltuu parhaiten kudoksissa vahvasti ilmenevien proteiinien tunnistamiseen entsyymireaktioon perustuvan signaalin vahvistamisen puuttuessa. Syklistä immunofluoresenssimenetelmää voidaan toteuttaa myös vasta-aineisiin kiinnitettyjä DNA-viivakoodeja ja niiden fluoresoivia vastinkoettimia hyödyntäen (2,12). Haluttaessa voidaan vahvistaa heikommin ilmenevän proteiinin antamaa signaalia puolestaan käyttämällä tyramidipohjaista menetelmää (tyramide

TAULUKKO 1. Esimerkkejä yleisimmistä immunohistokemiallisista monivärjäysmenetelmistä.

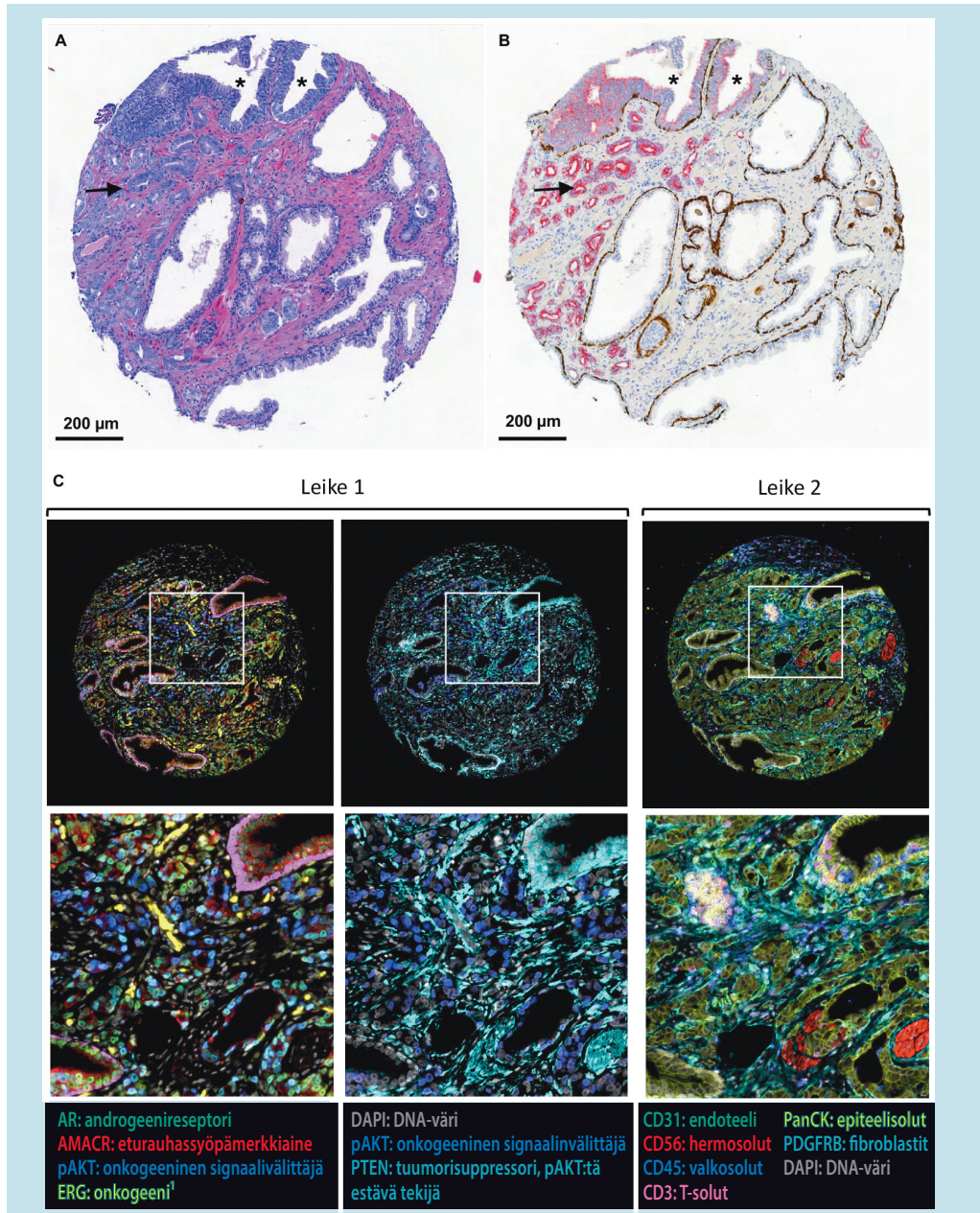
Menetelmä ja englanninkielinen lyhenne	Periaate	Värien määrä	Edut	Heikkoudet
Kromogeeninen moniväri-IHC (mIHC)	Samanaikainen tai peräkkäinen väriaineisiin perustuva menetelmä ilman väriaineiden poistoa	Noin 2–5	Tavanomainen patologian laboratorion laitteisto ja valomikroskooppi	Kohdeantigeenien ilmenemisen samoissa soluissa aiheuttaa hankalatulkintaisia väriyhdistelmiä Värjäytymisvoimakkuuden mittaaminen vaativaa
Jaksoittainen moniväri-IHC (MICSSS)	Toistuvat väriaineeseen perustuvat värjäyskierrokset siten, että syklien välissä näyte skannataan ja edeltävä värireaktio poistetaan	Noin 2–10	Tavanomainen patologian laboratorion laitteisto	Hitaus (päivässä mahdollista tunnistaa 1–2 merkkiainetta) Värjäytymisvoimakkuuden mittaaminen vaativaa
Suora moniväri-IF (mIF)	Käytetään suoraan primaarivasta-aineisiin kiinnitettyjä fluoresoivia merkileimoja	Noin 2–4	Tavanomainen patologian laboratorion laitteisto sekä fluoresenssimikroskooppi tai -skanneri Kohdeantigeenin määrän arvioinnissa tarkin värjäysmenetelmä	Signaalivahvistuksen puuttumisen vuoksi soveltuu vain antigeeneille, joita on kudoksessa runsaasti Kudosten autofluoresenssi voi aiheuttaa ongelmia
Syklinen suora moniväri-IF (CyCIF)	Tehdään suoraa moniväristä immunofluoresenssia jaksoittaisesti, ja jaksojen väleissä näyte skannataan ja edeltävät merkkiaineet inaktivoidaan	Noin 2–20	Tavanomainen patologian laboratorion laitteisto sekä fluoresenssiskanneri Fluoresenssivärjäyksissä värjäytymisvoimakkuus on mitattavissa tarkemmin kuin kromogeenivärjäyksissä	Signaalin vahvistuksen puuttumisen vuoksi soveltuu vain vahvasti ilmeneville merkkiaineille Kudosten autofluoresenssi voi aiheuttaa ongelmia
Tyramidisignaali vahvistukseen perustuva moniväri-IF (TSA)	Tyramidileimatut fluoroforit reagoivat piparjuuriperoksidaasi (HRP)-entsyymin kanssa, kiinnittyvät tiukasti kohdekudokseen ja mahdollistavat signaalin vahvistamisen Menetelmää voidaan soveltaa myös kromogeenisena	Noin 2–9	Signaalin vahvistus mahdollistaa heikosti ilmenevien kohdemolekyylien tutkimisen Yhdellä kertaa on mahdollista tutkia useita merkkiaineita ilman välissä tehtäviä näytteen skannauksia	Useita fluoroforeja samanaikaisesti käytettäessä niiden erottelu toisistaan voi olla vaativaa Kudosten autofluoresenssi voi aiheuttaa ongelmia Signaalin vahvistuksen takia värjäystulos korreloi huonosti kohdeantigeenin määrän kanssa
DNA-viivakoodeihin perustuva moniväri-IF (esimerkiksi CODEX)	Käytetään suoraan vasta-aineisiin kiinnitettyjä DNA-viivakodeja	Noin 2–50	Yhdellä kertaa on mahdollista tutkia suuri määrä merkkiaineita	Hitaus Kallis hinta
Massaspektrometriaan perustuva moniväri-IHC (esimerkiksi EMS-IHC: MIBI-TOF tai IMC)	Käytetään suoraan vasta-aineisiin kiinnitettyjä metallileimoja, jotka tunnistetaan massaspektrometrian avulla	Noin 2–50	Yhdellä kertaa on mahdollista tutkia suuri määrä merkkiaineita Ei autofluoresenssi-ongelmaa	Hitaus Kallis hinta

IF = immunofluoresenssi; IHC = immunohistokemia; CODEX = co-detection by indexing; EMS-IHC = elemental mass spectrometry immunohistochemistry; IMC = imaging mass cytometry; MIBI-TOF = multiplex ion beam imaging by time of flight; MICSSS = multiplexed immunohistochemical consecutive staining on single slide; mIF = multiplex immunofluorescence; mIHC = multiplex immunohistochemistry; TSA = tyramide signal amplification

signal amplification, TSA), jossa fluoroforit kiinnittyvät tiukasti kudokseen entsyymireaktion seurauksena (2,9). Fluorokromeista osa voi olla tyramidileimattuja ja osa tavanomaisia, ja moniväristä immunohistokemiaa sekä mo-

niväristä immunofluoresenssia voidaan myös yhdistää samaan leikkeeseen (13).

Viime vuosina on kehitetty myös massaspektrometriaan pohjautuvia menetelmiä, jotka perustuvat vasta-aineisiin kiinnitettyihin metal-



¹ERG: ilmentyy syöpäsoluissa, joissa on TMPRSS-ERG-translokaatio. Ilmentyy myös normaaleissa endoteelisoluissa.

KUVA 2. Esimerkki perusvärjäyksestä, immunohistokemiallisesta kaksoisvärjäyksestä ja moniväri-immunofluoresenssivärjäyksestä eturauhassyövän diagnostiikassa sekä ennusteen tai hoitovasteen kannalta merkityksellisten tekijöiden määrittämisessä. **A.** Hematoksyliini-eosinivärjätystä leikkeessä erottuu eturauhasen adenokarsinoomalle ominaisia atyyppisen epiteelin reunustamia pienikokoisia rauhasputkia (nuoli) hyvänlaatuisten rauhasen ja esiastemuutoksen (*), eturauhasen epiteelinsisäinen neoplasia) lomassa. **B.** Adenokarsinoomaa edustavat rauhaset (AMACR+, p63/CK5/6–), esiastemuutos (AMACR+, p63/CK5/6+) ja hyvänlaatuiset rauhaset (AMACR–, p63/CK5/6+) erottuvat selvemmin kaksivärisestä immunohistokemiallisesta määrittäyksestä (punainen: AMACR muuntuneissa luminaalisissa soluissa, ruskea: p63/CK5/6 basaalisissa soluissa). **C.** Näytteen solukoostumuksesta ja molekulaarisista ominaisuuksista voidaan saada yksityiskohtaisempaa tietoa moniväri-immunofluoresenssin menetelmällä. Esimerkissä esitetään pseudovärjättyjä kuvia, joissa värisävyt eivät kaikilta osin vastaa fluoroforien emittoiman valon väriä. Värjäysten tulkinta koskee vain yllä olevaa kuvaa eikä ole yleistettävissä muihin kudoksiin.

AMACR = alfametyyliasyyli-koentsyymi-A-rasemaasi, CK = sytokeratiini

Uusia monivärimenetelmiin perustuvia ennustetekijöitä

Monivärikuvantaminen on jo arkipäivää monissa tutkimuslaboratorioissa (16). Tulevaisuudessa monivärikuvantamisen avulla pystytään saamaan muun muassa syöpien hoitomuotojen valintaan vaikuttavaa yksityiskohtaista ennusteellista tietoa. Syöpäsoluja ympäröivät tulehdussolut ja strooman muut solut muodostavat yhdessä syöpäsolujen kanssa monimutkaisen verkoston, jossa monivärikuvantamisella on paikkansa paitsi eri solujen ja niiden kypsyysasteen tunnistamisessa myös solujen keskinäisen sijainnin määrittämisessä (KUVA 2) (16–18).

Tietokonepohjaisten kuva-analyysiohjelmien kehitys on mahdollistanut yksittäisten solujen aiempaa tarkemman tunnistamisen ja luokittelun kudosnäytteissä. Lupaaviksi sovel-luskohteiksi on esimerkiksi syöpätutkimukses-sa esitetty kasvaimen reuna-alueiden, imusol-muke-etäpesäkkeiden ja kasvainverisuonten tunnistusta sekä tulehdussolujen tyypittämistä ja niiden sijainnin määrittystä suhteessa kasvain-soluihin (19).

Syväoppimiseen perustuvilla kuva-analyysityökaluilla on perusvärjätyiltäkin (hematoksy-liini-eosiini-) näytelaseilta ja yhden antigeenin immunohistokemiallisista värjäyksistä kyetty tunnistamaan taudin ennusteeseen ja hoi-tojen valintaan vaikuttavia piirteitä (20,21). Esimerkiksi keuhkopussin mesotelioomassa monivärimenetelmää ja digitaalista pikselipoh-jaista kuva-analyysia hyödyntämällä PDGFRB (platelet-derived growth factor receptor beta)-proteiinin ilmentymisen kasvainsoluissa on osoitettu ennustavan lyhempää elinaikaa. Löy-dös on edelleen validoitu yhden antigeenin immunohistokemiaan yhdistetyllä syväoppimi-seen perustuvalla kuva-analyysimenetelmällä (22).

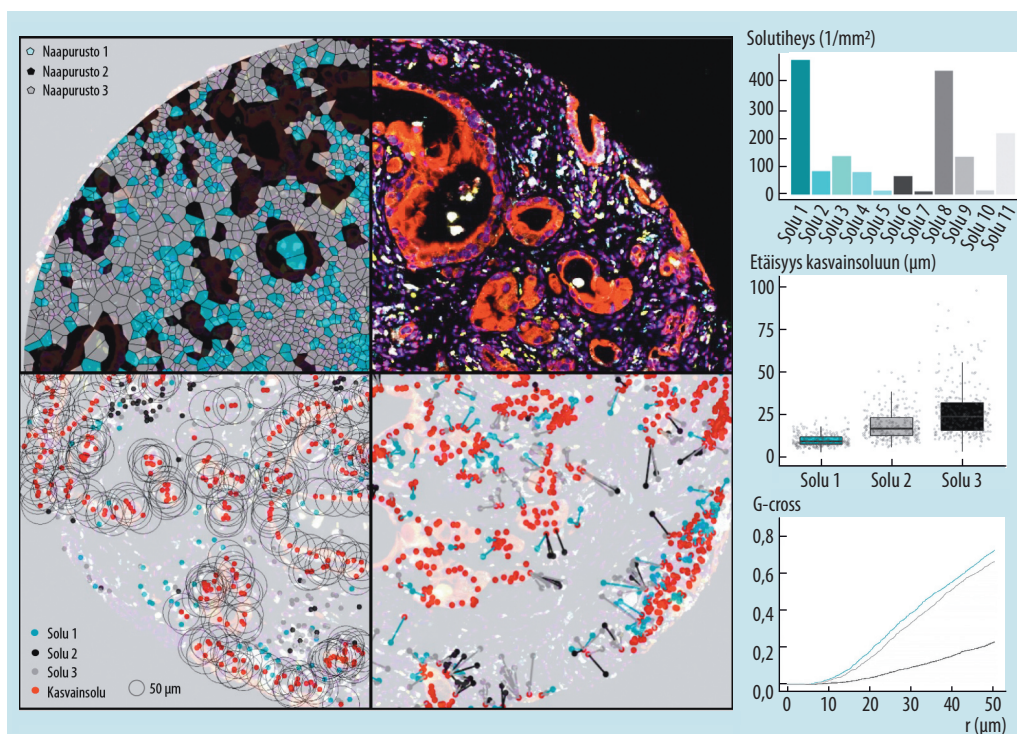
Keuhkopussin mesoteliooman tulehdussolu-jen yksityiskohtaisella tyypittämällä monivä-rikuvantamista hyödyntämällä on lisäksi tun-nistettu potilaan elinaikaa ennustavia tulehdus-solutyyppejä (23). Yhdistämällä tekoälyavus-teeseen kuva-analyysiin monivärikuvantamista sekä genomista analyysia on jatkossa mahdol-

Ydinasiat

- ▶ Immunohistokemiallisten monivärjäysten avulla saadaan tunnistetuksi kudosnäyt-teistä samanaikaisesti useiden antigeenien ilmenemistä.
- ▶ Menetelmä on otettu käyttöön sovelta-miskohteissa, joissa on tarpeellista arvioi-da useamman antigeenin ilmenemistä sa-massa solussa tai läheisissä soluissa.
- ▶ Tutkimuskäytössä monivärjäyksillä on kyetty tunnistamaan samanaikaisesti kym-meniä molekyyliä ja laskemaan yksityis-kohtaisia tietoja solutyypin sijainneista.
- ▶ Tulevaisuudessa monivärimenetelmiä voi-daan yhä enemmän hyödyntää sairauksien ennusteeseen ja hoitopäätöksiin vaikutta-vien tekijöiden arvioinnissa.
- ▶ Haasteina ovat esimerkiksi syntyvän tie-don käsittely, tulkinta ja varastointi sekä menetelmien laaduntarkkailu.

lista parantaa entisestään kudosnäytteistä saata-van tiedon käyttömahdollisuuksia taudin kulun ja hoitojen tehon ennustamisessa (24–26).

Keskeinen monivärimenetelmien etu on kyky määrittää useiden antigeenien ilmenemis-tä kudoksessa yksittäisen solun tarkkuudella (2). Tämä mahdollistaa muun muassa solu-tyyppien yksityiskohtaisemman tunnistamisen useiden merkkiaineiden yhdistelmän perusteel-la ja useiden solutyypin tutkimisen samanaikaisesti sekä solujen sijaintien ja välimatkojen arvioinnin. Eri solutyypin keskinäisiä sijain-teja voidaan arvioida lukuisilla erityyppisillä laskennallisilla menetelmillä (18). Esimerkiksi kasvaimen lähiympäristön tulehdussolujen ja kasvainsolujen keskinäisistä suhteista voidaan saada käsitystä mittaamalla etäisyyksiä kasvain-solukosta lähimpiin immuunisoluihin, laske-malla todennäköisyyksiä sille, että kasvainsolu-jen lähellä on tiettyntyyppisiä immuunisoluja tietyn säteen sisällä (niin kutsuttu G-cross-ana-lyysi) tai luokittelemalla kudosalueita erilaisiksi naapurustoiksi lähitöllä olevien solutyypin mukaisesti (esimerkiksi haimasyövän runsas-granulosyyttinen naapurusto) (KUVA 3).



KUVA 3. Esimerkki moniväri-immunofluoresenssivärjäyksen soveltamisesta kudostutkimuksessa. Kuvassa on tunnistettu kasvainsolukkoa ja immuunisoluja haimasyöpänäytteestä. Oikean yläkulman kuva on monivärinen yhdistelmäkuva, joka on pseudovärjätty eli värisävyt eivät kaikilta osin vastaa fluoroforien emittoiman valon väriä. Näytteestä on määritetty solutiheyksiä ja solujen etäisyyksiä toisistaan (oikea alakulma), yksityiskohtaisia malleja solukon jakaumasta (vasen alakulma) sekä solukoostumukseen perustuvia solunaapurustoja (vasen yläkulma), ja tuloskuvat esitetään läpikuultavina alkuperäisen monivärikuvas päällä. Näytteen oikealla puolella on esimerkinomaisia tuloskaavioita. G-cross-funktion mukaan arvioidaan todennäköisyyttä sille, että kasvainsolulla on vähintään yksi tietyntyyppinen immuunisolu r μm:n etäisyydellä.

Monissa muissa viime vuosina yleistyneissä menetelmissä, kuten yhden solun RNA-sekvensoinnissa tai monikanavaisessa virtausytometriassa menetetään tietoa solukon avaruudellisesta (spatiaaliseen) sijainnista kudoksessa. Useissa syöpätaudeissa tulehdussolukon sijainnilla suhteessa syöpsoluihin on kuitenkin esitetty olevan merkitystä sekä syövän hoitovastetta että ennustetta määrittäessä. Esimerkiksi paksusuolisyövässä T-solujen sijainti kasvainsolukon läheisyydessä vaikuttaa ennustavan taudinkulkua T-solutiheyksiä luotettavammin, ja myös haimasyövässä sytotoksisten T-solujen sijainti kasvainsolukon lähellä viittaa parempaan ennusteeseen, kun taas immuunijärjestelmää lamaavien M2-tyypin makrofagien sijainti kasvainsolukon läheisyydessä on huonon ennusteen merkki (27–29).

Proteiinipohjaisten immunohistokemia- ja immunofluoresenssinmenetelmien ohella kehi-

tetään muun muassa monivärisiä in situ -hybridisaatiomenetelmiä. Eri yhdistelmiä käyttämällä on mahdollista saada yhä kattavampi kuva geenien ilmenemisestä kudostäyteiden alueella (30). Näissä menetelmissä ja massaspektrometriaan perustuvissa proteiinipohjaisissa menetelmissä päästään jo kymmenien, satojen tai jopa tuhansien merkkiaineiden samanaikaiseen mittaamiseen, mikä luo yhä enemmän haasteita saatavan tiedon jatkokäsittelylle (31).

Monikanavainen mikroskopiadata vaatii moninkertaisen tallennuskapasiteetin valomikroskopiaskannauksiin verrattuna. Tautien luokittelun ja hoidon sekä ennusteen määrittämisen kannalta keskeisen tiedon poimiminen suuresta tietomäärästä edellyttää siten paitsi tehokkaita analyysimenetelmiä ja näihin käytettäviä laitteistoja myös riittävän suuria varastoja tiedon tallentamiseen. Yhdestä näytteestä tutkittavien kohdemolekyylien määrän lisääntyessä myös

menetelmien laaduntarkkailu nousee entistä merkittävämpään osaan.

Monivärimenetelmiin liittyy runsaasti mahdollisia virhelähteitä, kuten värjäyssarjan reagenssien, esimerkiksi vasta-aineiden, keskinäisen vuorovaikutuksen mahdollisuus tai muutokset antigeenien rakenteessa värjäyssarjan aikana esimerkiksi toistuvien kuumentamisten vuoksi, fluoroforien emissiospektrien päällekkäisyys tai läpivuoto sekä kudoksen autofluoresenssin sekoittuminen spesifiseen signaaliin. Kansainvälinen tutkijaryhmä on suositellut keskeisenä osana immunohistokemiallisen monivärjäyksen pystyttämistä kunkin antigeenin värjäytymisen kartoittamista yksivärimenetelmällä ja vertaamista monivärjäyksessä nähtyyn värjäytymiseen menetelmän toiminnan varmistamiseksi (16). Tämä on sitä työläämpää, mitä enemmän merkkiaineita on käytössä.

Kun yhden leikkeen monivärikuvantamisen vakiinnuttaa paikkaansa tutkimuskentällä, viimeaikaisimpina tutkimussovelluksina kudoksen monivärikuvantamisessa siirrytään kolmiulotteiseen kuvantamiseen ja genomisen tiedon yhdistämiseen kudoksen monivärikuvantamiseen tietokoneavusteisesti (32). Useammassa tutkimuslaboratoriossa kehitetään menetelmiä yhdistämään peräkkäisiä leikkeitä

syöpäkudoksesta ja rakentamaan näin syövän lähiympäristön kolmiulotteinen malli (32). Tämä voi entisestään lisätä kudosten rakenteen ja solukon vuorovaikutussuhteiden arviointimahdollisuuksia. Kaikkien tässä käsiteltyjen menetelmien ja sovellusten käyttöönotto edellyttää kuitenkin vielä laajempaa kliinistä validatiota ja kustannus-hyötöanalyysia.

Lopuksi

Moniväristen kudostutkimusmenetelmien käyttöönotto kliinisessä potilastyössä on vielä alkuvaiheessa ja rajoittuu lähinnä harvoihin kaksoisvärjäysmenetelmiin yksittäisissä diagnostiikan sovelluksissa. Kun nykyinen tutkimusmielenkiinto painottuu etenkin syövän ennusteellisten ja hoitopäätöksiä ohjaavien tekijöiden määrittämiseen, on lähivuosina odotettavissa tähän liittyviä käyttösovelluksia. Menetelmien edelleen kehittyessä tulevaisuudessa käyttöön saataneen entistä kattavampaa, kymmenien merkkiaineiden samanaikaista monivärikuvantamista, mikä yhdistettynä koneoppimiseen pohjautuviin kuva-analyysityökaluihin voi mahdollistaa yksityiskohtaisen kudusrakenteen piirteiden käytön hoitopäätöksiä ohjaavana tekijänä. ■

JUHA VÄYRYNEN, LT, dosentti, patologian erikoislääkäri
Oulun yliopisto, translationaalisen lääketieteen tutkimusyksikkö
OYS, patologian osasto

SARA VÄYRYNEN, LT, sisätauteihin erikoistuva lääkäri
OYS, Sisätautikeskus

HELY OLLILA-RAJ, LK, väitöskirjatutkija
Suomen molekyyliiläketieteen instituutti (FIMM), Helsinki
Institute of Life Science (HiLIFE), Helsingin yliopisto

TEIJO PELLINEN, FT, yliopistotutkija
Suomen molekyyliiläketieteen instituutti (FIMM), Helsinki
Institute of Life Science (HiLIFE), Helsingin yliopisto

TUOMAS MIRTITI, LT, dosentti, osastonylilääkäri
HUS, Diagnostiikkakeskus, patologia
Helsingin yliopisto, systeemisen syöpälääketieteen tutkimusohjelma (Oncosys)
Twitter: @MirtitiTuomas

VASTUUTOIMITTAJA
Riikka Nevala

SIDONNAISUUDET

Juha Väyrynen: Ei sidonnaisuuksia

Sara Väyrynen: Ei sidonnaisuuksia

Hely Ollila-Raj: Ei sidonnaisuuksia

Teijo Pellinen: Apuraha (Targovax ASA)

Tuomas Mirtti: Apuraha (Roche, Merck, Pfizer, Nektar Therapeutics, Suomen Akatemia, Suomen Syöpäjärjestöt, Suomen Lääketieteen Säätiö, Helsingin yliopisto, Sigrid Juséliuksen Säätiö), luentopalkkio/asiantuntijapalkkio (Merck, Astellas, Astra Zeneca, Aiforia Technologies Oyj), korvaukset koulutus- ja kongressikuluista (Pfizer), muut sidonnaisuudet (Aikakauskirja Duodecim, Medmil Oy, Terveysresurssi Oy)

KIRJALLISUUTTA

1. Matos LL de, Trufelli DC, de Matos MGL, ym. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* 2010;5:9–20.
2. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, ym. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun (London, England)* 2020;40:135–53.
3. Kim S-W, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *J Pathol Transl Med* 2016;50:411–8.
4. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, ym. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1720–48.
5. Petersen KH, Lohse J, Ramsgaard L. Automated sequential chromogenic IHC double staining with two HRP substrates. *PLoS One* 2018;13:e0207867.
6. Ortega S, Halicek M, Fabelo H, ym. Hyperspectral and multispectral imaging in digital and computational pathology: a systematic review. *Biomed Opt Express* 2020;11:3195–233.
7. Remark R, Merghoub T, Grabe N, ym. In-depth tissue profiling using multiplexed immunohistochemical consecutive staining on single slide. *Sci Immunol* 2016;1:aaf6925.
8. Liudahl SM, Betts CB, Sivagnanam S, ym. Leukocyte heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma: phenotypic and spatial features associated with clinical outcome. *Cancer Discov* 2021;11:2014–31.
9. Hernandez S, Rojas F, Laberiano C, ym. Multiplex immunofluorescence tyramide signal amplification for immune cell profiling of paraffin-embedded tumor tissues. *Front Mol Biosci* 2021;8:667067.
10. Väyrynen JP, Haruki K, Lau MC, ym. Spatial organization and prognostic significance of NK and NKT-like cells via multimer analysis of the colorectal cancer microenvironment. *Cancer Immunol Res* 2022;10:215–27.
11. Lin JR, Izar B, Wang S, ym. Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *Elife* 2018;7:151738.
12. Schürch CM, Bhate SS, Barlow GL, ym. Coordinated cellular neighborhoods orchestrate antitumoral immunity at the colorectal cancer invasive front. *Cell* 2020;182:1341–59.e19.
13. Blom S, Paavolainen L, Bychkov D, ym. Systems pathology by multiplexed immunohistochemistry and whole-slide digital image analysis. *Sci Rep* 2017;7:15580.
14. Keren L, Bosse M, Thompson S, ym. MIBI-TOF: a multiplexed imaging platform relates cellular phenotypes and tissue structure. *Sci Adv* 2019;5:eaax5851.
15. Molinié V, Fromont G, Sibony M, ym. Diagnostic utility of a p63/alpha-methyl-CoA-racemase (p504s) cocktail in atypical foci in the prostate. *Mod Pathol* 2004;17:1180–90.
16. Taube JM, Akturk G, Angelo M, ym. 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:e000155.
17. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 2022;12:31–46.
18. Parra ER. Methods to determine and analyze the cellular spatial distribution extracted from multiplex immunofluorescence data to understand the tumor microenvironment. *Front Mol Biosci* 2021;8:668340.
19. Wang S, Yang DM, Rong R, ym. Pathology image analysis using segmentation deep learning algorithms. *Am J Pathol* 2019;189:1686–98.
20. Echle A, Rindtorff NT, Brinker TJ, ym. Deep learning in cancer pathology: a new generation of clinical biomarkers. *Br J Cancer* 2021;124:686–96.
21. Skrede OJ, De Raedt S, Kleppe A, ym. Deep learning for prediction of colorectal cancer outcome: a discovery and validation study. *Lancet* 2020;395:350–60.
22. Ollila H, Paajanen J, Wolff H, ym. High tumor cell platelet-derived growth factor receptor beta expression is associated with shorter survival in malignant pleural epithelioid mesothelioma. *J Pathol Clin Res* 2021;7:482–94.
23. Ollila H, Mäyränpää MI, Paavolainen L, ym. Prognostic role of tumor immune microenvironment in pleural epithelioid mesothelioma. *Front Oncol* 2022;12:870352.
24. Chen RJ, Lu MY, Williamson DFK, ym. Pan-cancer integrative histology-genomic analysis via multimodal deep learning. *Cancer Cell* 2022;40:865–878.e6.
25. Rojas F, Hernandez S, Lazcano R, ym. Multiplex immunofluorescence and the digital image analysis workflow for evaluation of the tumor immune environment in translational research. *Front Oncol* 2022;12:889886.
26. Launonen IM, Lyytikäinen N, Casado J, ym. Single-cell tumor-immune microenvironment of BRCA1/2 mutated high-grade serous ovarian cancer. *Nat Commun* 2022;13:835.
27. Elomaa H, Ahtiainen M, Väyrynen SA, ym. Prognostic significance of spatial and density analysis of T lymphocytes in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2022;127:514–23.
28. Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, ym. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun* 2017;8:15095.
29. Väyrynen SA, Zhang J, Yuan C, ym. Composition, spatial characteristics, and prognostic significance of myeloid cell infiltration in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2021;27:1069–81.
30. Atout S, Shurab S, Loveridge C. Evaluation of the suitability of RNAscope as a technique to measure gene expression in clinical diagnostics: a systematic review. *Mol Diagn Ther* 2022;26:19–37.
31. Eisenstein M. How to make spatial maps of gene activity - down to the cellular level. *Nature* 2022;606:1036–8.
32. Hofmann J, Keppler SJ. Tissue clearing and 3D imaging - putting immune cells into context. *J Cell Sci* 2021;134:jcs258494.