

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Patologia  
2012

Sami Kyyhkynen

# KLIINISEN LIHASBIOPSIADIAGNOSTIIKAN TUTKIMUSMENETELMIÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Patologia

Joulukuu 2012 | 27

Mika Venojärvi, Matias Röyttä

Sami Kyyhkynen

# KLIINISEN LIHASBIOPSIADIAGNOSTIIKAN TUTKIMUSMENETELMIÄ

Lihاسبiopsian histopatologinen tutkimus saattaa tuoda esiin diagnoosin kannalta keskeiset muutokset, mutta sen avulla ei kuitenkaan aina voida yksiselitteisesti diagnosoida neuromuskulaarisairauksia.

Opinnäytetyön tavoitteena on koota yhteen ja tuottaa tiivis tietopaketti käytössä olevista lihasbiopsian tutkimusmenetelmistä laboratorion ja terveydenhuollon henkilökunnalle sekä muille aiheesta kiinnostuneille lihasbiopsiadiagnostiikasta löytyviin lähteisiin perustuen.

Tutkimusmenetelmät ovat lihasbiopsian mikroskooppitutkimusta varten tehtäviä kudoksenäytteen histologisia värjäyksiä, jotka voidaan jakaa histokemiallisiin, entsyymihistokemiallisiin ja immunohistokemiallisiin värjäysmenetelmiin. Nämä värjäysmenetelmät ovat esitelty valittujen esimerkkisairauksien pohjalta. Histologisia värjäysmenetelmiä kuvattaessa käytetään esimerkkisairauksina Duchennen ja Beckerin lihasdystrofiaa.

ASIASANAT:

Luustolihas, lihasbiopsia, histologia, morfologia.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science | Pathology

December 2012 | 27

Mika Venojärvi, Matias Røyttä

Sami Kyyhkynen

## EXAMINATION METHODS IN MUSCLE BIOPSY DIAGNOSTICS

Examination of muscle biopsy may reveal significant findings in diagnosing muscle diseases but it will not always lead to correct diagnose.

The purpose of this study was to describe the most commonly used methods in examination of muscle biopsy in Finland and make an intense package of information designated for all personnel working in area of health care, laboratory and individuals who are interested in this particular subject. This study is based on scientific literature and other sources related to subject examined.

These methods for staining the preparation are histochemical, enzyme histochemical and immunohistochemical stainings. In describing the outcome of histological stainings in this particular study two diseases are used as examples: Duchenne and Becker muscle dystrophy.

KEYWORDS:

Skeletal muscle, muscle biopsy, histology, morphology.

# SISÄLTÖ

<b>SANASTO</b>	<b>5</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>6</b>
<b>2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT</b>	<b>8</b>
2.1 Lihaskudos	8
2.2 DNA- eli Southern Blot-hybridisaatio	10
2.3 Western Blot	10
2.4 Geenien kytkentäanalyysi	11
2.5 Polymeerasiketjureaktio eli PCR	11
2.6 Lihassairaudet ja neuromuskulaaritaudit	12
2.6.1 Yleisimmät lihassairaudet ja neuromuskulaaritaudit	13
2.6.2 Neuromuskulaarisairauden diagnoosi	15
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT</b>	<b>16</b>
<b>4 KLIINISEN LIHASBIOPSIADIAGNOSTIIKAN TUTKIMUSMENETELMIÄ</b>	<b>16</b>
4.1 Lihasbiopsia	16
4.2 Genetiikka	19
4.3 Mikroskopia	20
4.3.1 Histokemialliset värjäysmenetelmät	20
4.3.2 Entsyymihistokemialliset tutkimukset	21
4.3.3 Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät	22
<b>5 OPINNÄYTETYÖN TULOKSET</b>	<b>24</b>

<b>6 POHDINNAT</b>	<b>24</b>
--------------------	-----------

<b>LÄHTEET</b>	<b>26</b>
----------------	-----------

## **KUVAT**

Kuva 1. Poikkijuovaisen lihaksen rakenne	9
Kuva 2. Valomikroskooppikuva luustolihasoluista	10
Kuva 3. Polymeerasiketjureaktio eli PCR	12
Kuva 4. Konkotomiabiopsia	17

## SANASTO

Biopsia	Näytteen ottaminen elävästä kudoksesta ja sen tarkastus
Histologia	Kudoksia ja soluja tutkiva tieteenhaara, kudosophi
Morfologia	Muoto-oppi
Mutaatio	Satunnainen muutos perimässä
Neuropatologia	Hermoston ja lihasten sairauksia tutkiva patologian osa
Patologia	Tautioppi
Sekvensointi	Menetelmä nukleiinihapon nukleotidijärjestyksen selvittämiseksi

# 1 JOHDANTO

Suomessa on nykyisten arvioiden mukaan noin 10 000 eriasteista neuromuskulaarisairautta sairastavaa potilasta. Yksi diagnoosiryhmä käsittää tavallisesti muutamasta kymmenestä muutama sataan henkilöä. (Udd 2007; Lihastautiliitto Ry 2012.) Kliinisen lihasbiopsiadiagnostiikan tutkimusmenetelmät sijoittuvat terveydenhuollon käytäntöön seuraavalla tavalla: Neuropatologian laboratorioon saapuvista lihasbiopsioista voidaan histopatologisten tutkimusmenetelmien avulla tuottaa oikea diagnoosi, ja sen perusteella kliinikot määräävät neuromuskulaarisairauksia sairastaville potilaille parhaan mahdollisen hoidon. Tutkimusmenetelmät kliinisessä lihasbiopsiadiagnostiikassa ovat koko ajan kehittyneet ja käyttöön on saatu uusia, esimerkiksi lihaskudoksen morfologian tulkintaa helpottavia immunohistokemiallisia värjäysmenetelmiä. Tuottavuus on tehostunut ja tulostarkkuus parantunut teknologian kehittyessä. Ollaan myös tietoisempia jo löydettyjen neuromuskulaarisairauksien etiologiasta, eli taudin syistä, ja tutkimus tuottaa koko ajan uutta tärkeää tietoa sekä näistä että auttaa löytämään uusia neuromuskulaarisairauksia käytössä olevien sekä uusien kehitettävien tutkimusmenetelmien avulla. (Udd 2011.)

Suomessa neuromuskulaarisairauksia sairastavista potilaista, joilla sairaus on diagnosoitu, noin 2/3 sairastaa perinnöllistä ääreishermoston tai lihasten sairautta. Näiden tautikirjo on varsin suuri, joten yksittäisen taudin potilasmäärät jäävät verraten pieniksi. Ääreishermon, hermolihaskudoksen ja lihaskudoksen tautien oireisto ja tutkimusmenetelmät ovat usein niin samanlaisia, että koko ryhmää käsitellään usein vain lihastauteina. Useimmat tämän ryhmän taudeista ovat perinnöllisiä ja voivat aiheuttaa vaikeata vammautumista. Näin niiden vaikutus ulottuu jopa monen sukupolven päähän. (Therapia Fennica 2012.) Lihaskudoksen mikroskooppitutkimus on lähtökohtainen keino diagnosoida neuromuskulaarisairauksia, jos niitä ei tiedettävästi esiinny suvussa. Sen lisäksi täytyy ottaa huomioon potilaan terveyshistoria ja suvun perintötekijöiden

vaikutus sekä kaikkien muiden terveydentilantutkimusten tulokset. (Dubowitz & Sewry 2007.) Lihasbiopsian histopatologinen tutkimus on joskus ratkaiseva ja tuo esiin diagnostiikassa keskeiset löydökset, mutta yksiselitteistä diagnoosia ei silti aina onnistuta saamaan sen avulla. (Therapia Fennica 2012.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli koota tiivis tietopaketti nykyisin yleisimmin käytössä olevista lihasbiopsian tutkimusmenetelmistä laboratorion ja terveydenhuollon henkilökunnalle sekä muille aiheesta kiinnostuneille.



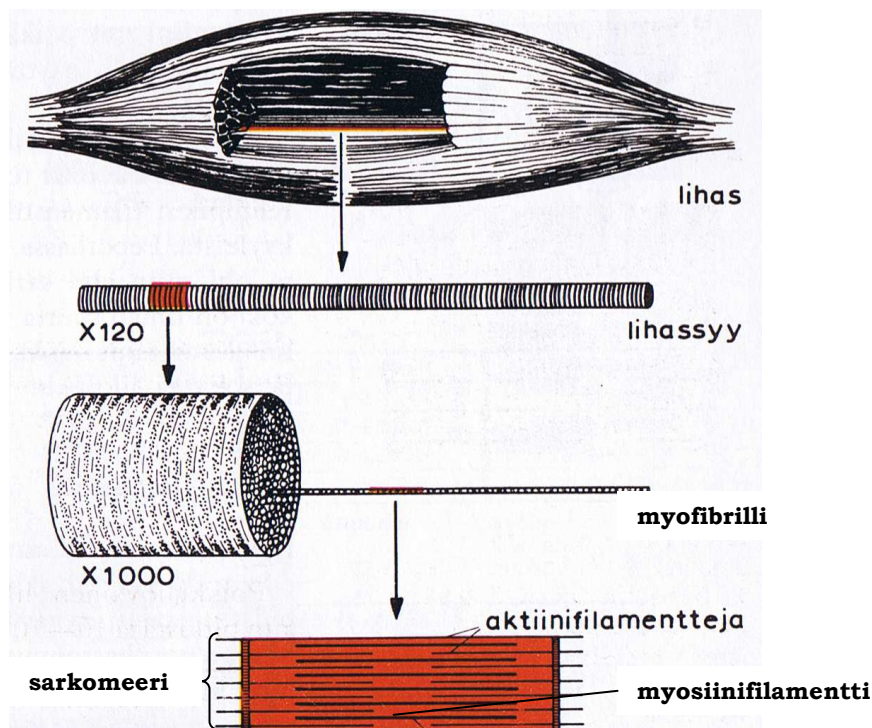
## 2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTISET LÄHTÖKOHDAT

### 2.1 Lihaskudos

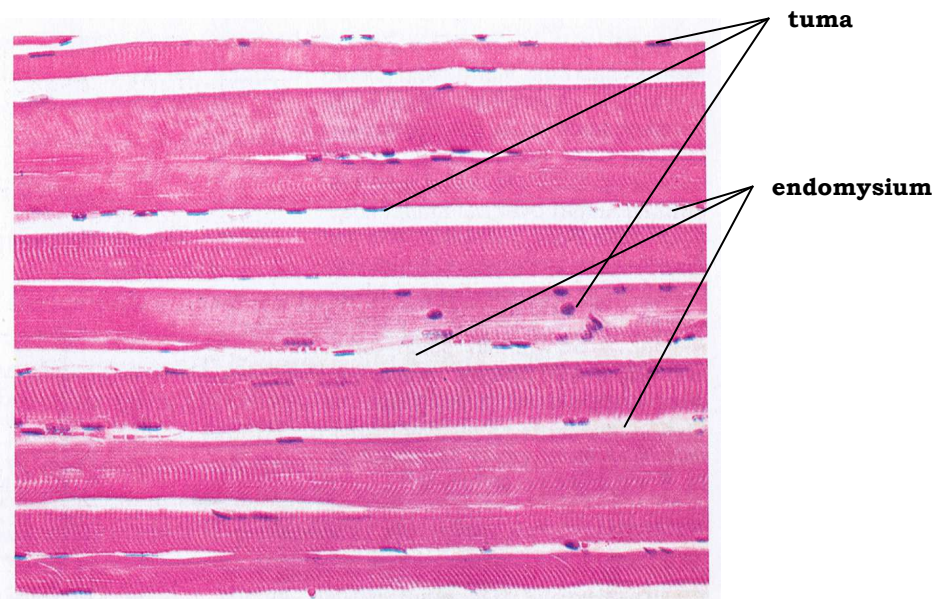
Lihaskudos voidaan jakaa poikkijuovaiseen (luustolihas), sileään ja sydänlihaskudokseen. Luustolihas toimii tahdonalaisesti somaattisen hermoston ohjaamana. Sileälihaskudos ja sydänlihaskudos toimivat autonomisen hermoston ohjaamina (tahdosta riippumaton). (Nienstedt ym. 2009.) Luustolihas väsyä rasituksessa toisin kuin sydänlihaksen solut. Myöskään sileän lihaksen solut eivät väsy ja niiden supistumisnopeus on huomattavasti hitaampi kuin luusto- ja sydänlihaksen solujen. Kliinisessä neuropatologiassa lihasbiopsianäyte otetaan useimmin luustolihaksesta etummaisen säärilihaksen alueelta, esimerkiksi musculus tibialis anteriorista. Lihaksen muodossa, koossa sekä histokemiallisissa ja histologisissa ominaisuuksissa esiintyy suurta vaihtelua, riippuen siitä mistä kohtaa lihasbiopsia on otettu. Olennaisesti lihasten rakenteeseen vaikuttavat myös ikä, perimä, sukupuoli, lihaksen tehtävä ja yksilön ravitsemustila. Lihassolun kokoon vaikuttaa positiivisesti voimaharjoittelu (hypertrofia) ja negatiivisesti liikkumattomuus (immobilisaatio) sekä perinnöllisestä syystä johtuva surkastuminen (atrofia), kuten selkäydin peräisessä atrofiassa (Spinal Muscular Atrophy), jolloin syy ei ole itse lihaksessa vaan lihaksen toimintaa ohjaavissa hermosoluissa. (Lihastautiliitto Ry 2009; Neuromuscular Home Page 2012; Nienstedt ym. 2009.)

Jokaista erillistä lihasta ympäröi sidekudoksinen lihaskalvo, eli epimysium (kuva 1) (Koistinen 1991). Epimysiumin peittämiä erillisiä lihaksia ympäröi peitinkalvo, eli fascia muodostaen luustolihaksen (Nienstedt ym. 2009). Kukin lihas rakentuu monitumaisista lihassoluista, eli lihassyistä (kuvat 1 ja 2) ryhmittäytyen lihaskalvon, eli perimysiumin ympäröimäksi lihassolukimpuksi. Lihassolua ympäröi solukalvo, eli sarkolemma. Lihassolujen välistä kiinnityskudosta kutsutaan endomysiumiksi (kuva 2). (Koistinen 1991.) Tässä sijaitsevat verisuonet ja hermot (Nienstedt ym. 2009). Lihassolun pituus voi olla kymmeniä

senttimetrejä. Sen rakenneseosia ovat sadat, jopa tuhannet myofibrillit (kuva 1) (Koistinen 1991.) ja niiden ympärillä solulimakalvosto, eli sarkoplasminen kalvosto (Hiltunen ym. 2005). Myofibrillejä muodostavat puolestaan myofilamenttikimput, jotka muodostuvat sarkomeereiksi järjestäytyneistä aktiini- ja myosiiniproteiineista (kuva 1) (Koistinen 1991). Myosiinien raskasketjujen avulla luustolihasen solujakauma voidaan myös jaotella immunohistokemiallisesti tyyppin I hitaisiin lihassoluihin (MHC I) tai tyyppin 2 nopeisiin lihassoluihin (MHC II) (Mahon ym. 1984; Staron ym. 2000). Lihassolussa solukalvon sisällä ovat sen tärkeät rakenteet; tuma (kuva 2), solulima, mitokondriot ja edellä mainitut myofibrillit (Koistinen 1991).



Kuva 1. Poikkijovaisen lihaksen rakenne (Muokattu: Nienstedt ym. 2009).



Kuva 2. Valomikroskooppikuva luustolihas-soluista, 320-kertainen suurennus (Muokattu: Nienstedt ym. 2009).

## 2.2 DNA- eli Southern Blot-hybridisaatio

DNA-hybridisaatiota käytetään tietyn DNA-sekvenssin tunnistamiseen näytteestä. Geelielektroforeesijon jälkeen denaturoidusta DNA:sta voidaan paikantaa haluttu sekvenssi käyttämällä leimattua komplementtisekvenssiä. (Solunetti 2006.) Tätä analyysiä käytetään muun muassa dystrofia myotonican (DM1) diagnosoinnissa ja tämän lisäksi tunnetaan tyypin 2 dystrofia myotonica (DM2), mutta sen todentaminen Southern blot-menetelmällä on vaikeampaa kuin DM1:n todentaminen. Geenitutkimus on tarpeellinen DM1:n ja DM2:n diagnoosien varmistamiseksi. (Auvinen ym. 2003.)

## 2.3 Western Blot

Eri sairauksien johdosta lihasproteiinien määrässä voi tapahtua muutoksia. Valmistetusta lihashomogenaatista voidaan mitata nämä muutokset

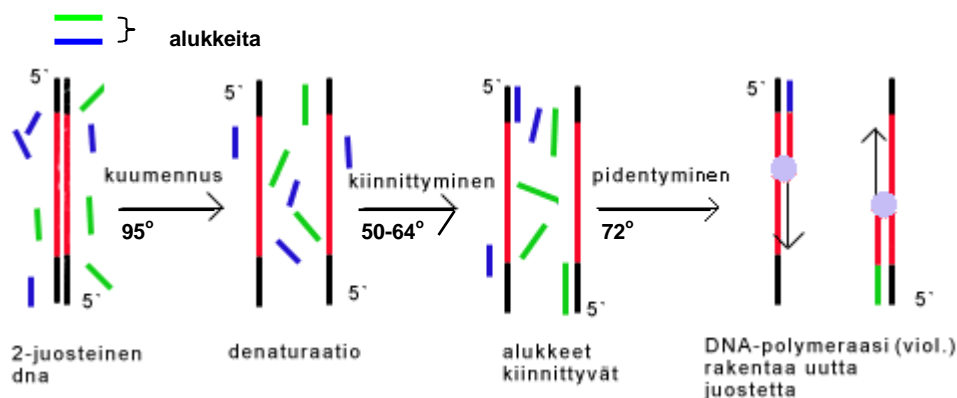
kvantifioimalla proteiinit elektroforeettisen erottelun ja niiden siirtämisen jälkeen esimerkiksi nitroselluloosakalvolle ja lopuksi värjäämällä ne spesifisillä leimatuilla vasta-aineilla. (Solunetti 2006; Walker 2005.)

## 2.4 Geenien kytkentäanalyysi

Geenien kytkentäanalyysin avulla pyritään selvittämään tiettyyn ominaisuuteen vaikuttavien geenien paikka genomissa koetinmarkkereita käyttämällä (Matikainen 2001). Esimerkiksi lihasperäisiin kongenitaalsiin myopatioihin, eli synnyntäisiin lihasheikkoutta aiheuttaviin lihassairauksiin, liittyvää geenien kytkentäanalyysiä voidaan hyödyntää sikiödiagnostiikassa. Kongenitaalisissa myopatioissa saman taudinkuvan aiheuttajana saattaa olla kuitenkin useita eri geenejä. (Lihastautiliitto Ry 2009; Somer & Auranen 1997.)

## 2.5 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

Yleisimmillä PCR-menetelmillä voidaan monistaa yksittäinen DNA-molekyyli miljooniksi kopioiksi. Reaktio tarvitsee toimiakseen monistettavan DNA:n, alukkeet, DNA-polymeraasin, nukleotidejä, puskuriliuoksen ja ioneja. Reaktio tapahtuu pienessä tilavuudessa koeputkessa, laitteessa, joka lämmittää ja jäähdyttää koeputkia halutun sarjan mukaisesti. Useimmiten PCR:ssä on 20-40 kolmivaiheista sykliä. Ensimmäinen kolmesta vaiheesta on aloitusvaihe, jossa reaktioseoksen lämpötila nostetaan niin korkealle, esimerkiksi +95 °C, että DNA denaturoituu, eli juosteet irtoavat toisistaan. Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan niin, että alukkeet voivat sitoutua yksijuosteisiin DNA-molekyyleihin. Tämä lämpötila on usein +50 - +64 °C ja riippuu alukkeiden ominaisuuksista. Kolmannessa vaiheessa lämpötila nostetaan DNA-polymeraasin toiminnalle optimaaliseksi, esimerkiksi +72 °C, jolloin DNA-polymeraasi syntetisoi yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteista DNA:ta. Viimeisen syklin kolmas vaihe on usein normaalia pidempi, että kaikki DNA-juosteet on varmasti polymerisoitu loppuun saakka. (Solunetti 2006; Suominen & Ollikka 2006.)



Kuva 3. Polymeerasiketjureaktio eli PCR, yksi sykli (Muokattu: Internetix 1997).

## 2.6 Lihassairaudet ja neuromuskulaaritaudit

Lihasperäisissä lihastaudeissa, esimerkiksi Duchennen lihasdystrofiassa, sairauden syy on itse lihassolussa ja sen toiminnassa. Keskushermoston motoristen hermosolujen toimintahäiriössä, esimerkiksi Werdnig-Hofmannin taudissa, sairauden syy on selkäydinperäinen. Esimerkiksi haurashermosairaudessa on kyse ääreishermon ja myastenia graviksessa hermolihasliitoksen toimintahäiriöstä. Hermo-lihasperäisiä eli neuromuskulaarisairauksia esiintyy tavallisimmin lapsilla, nuorilla ja työikäisillä aikuisilla, eivätkä ne yleensä vaikuta älyllisiin tai henkisiin ominaisuuksiin. (Lihastautiliitto Ry 2009.)

Lihastauti voi ilmetä jo vastasyntyneellä, myöhemmin lapsuudessa, nuoruudessa tai vasta aikuisuudessa. Saman diagnoosin vaikeusaste voi vaihdella jopa saman perheen jäsenillä lievästä toiminnan häiriöstä vaikeavammaisuuteen. (Lihastautiliitto Ry 2009.)

Lihastautidiagnoseille ei aina ole suomenkielistä nimeä, vaan nimi tulee tautia tutkineen tai sen löytäneen lääkärin mukaan. Nimet tulevat myös sairauksien latinan- tai englanninkielisistä nimistä. (Lihastautiliitto Ry 2009.)

### 2.6.1 Yleisimmät lihassairaudet ja neuromuskulaaritaudit

Yleisimmät lihassairaudet ja neuromuskulaaritaudit voidaan jakaa kolmeen pääryhmään:

- Lihasperäiset lihastaudit
- Hermolihasliitosperäiset lihastaudit
- Hermoperäiset lihastaudit

## **LIHASPERÄISET LIHASTAUDIT**

### Lihasdystrofiaita

- Duchennen lihasdystrofia (DMD)
- Beckerin lihasdystrofia (BMD)
- Emery-Dreifussin lihasdystrofia (EDMD)
- Facioscapulohumeraalinen lihasdystrofia (FSHD)
- Limb-girdle lihasdystrofia (LGMD)
- Tibiaalinen lihasdystrofia (TMD)

### Kongenitaaliset lihasdystrofiat -synnynnäiset lihasdystrofiat

- Kongenitaalinen lihasdystrofia (CMD)
- Lihas-silmä-aivo-oireyhtymä (MEB)

### Kongenitaaliset myopatiat - synnynnäiset lihassairaudet

- Syytyyppiepäsuhta (fibre type disproportion)
- Minicore eli multicore myopatia
- Myotubulaarinen eli sentronukleaarinen myopatia
- Nemaliinimyopatia (NM)
- Central core myopatia (CCD)

### Myotoniat - liiallinen lihasjännitys

- Myotonia congenita (MC; Thomsen, Becker)
- Dystrofia myotonica = DM1 (MMD, Steinertin tauti)

- Proksimaalinen myotoninen dystrofia = DM2 (PROMM)
- Kongenitaalinen dystrofia myotonica (CMyD)
- Paramyotonia congenita (PC)

Myosiitit - tulehdukselliset lihastaudit

- Polymyosiitti (PM)
- Dermatomyosiitti (DM)
- Inklusiokappalemyosiitti (IBM)

Metaboliset myopatiat - lihaskudoksen aineenvaihdunnalliset lihastaudit ja mitokondriaaliset oireyhtymät -solujen energiatuotannon häiriöt

Lihasperäiset

- Mc-Ardle - glykogenoosimyopatia
- Kearns-Sayren oireyhtymä
- Progressiivinen externaalinen ophthalmoplegia, etenevä silmälihashalvaus, roikkuluomi (PEO)

Aivoperäiset

- Myopathia/Enkefalopathia/Laktaattiasidoosi, aivoperäinen sairaus (MELAS)

Muut

- Ääreishermostojen ja verkkokalvon rappeuma, ataksia (NARP)
- Myokloninen epilepsia/repalesyyt (MERRF)

Periodiset paralyysit - ohi menevät lihasten halvauskohtaukset

- hyperkaleminen periodinen paralyysi
- hypokaleminen periodinen paralyysi

## **HERMOLIHASLIITOSPERÄISET LIHASTAUDIT**

Myasteniat - halvausmainen lihasheikkous ja väsyvyys

- Myastenia gravis (MG)
- Kongenitaalinen myasteninen syndrooma (CMS)
- Lambert-Eatonin syndrooma (LEMS)

## **HERMOPERÄISET LIHASTAUDIT**

Polyneuropatiat - periytyvät ääreishermostosairaudet

### Hereditääriset motosensoriset neuropatiat – HMSN

- HMSN I, HMSN II, HMSN III (Dejérine-Sottas)
- Charcot-Marie-Tooth (CMT)
- Haurashermosairaus (HNPP)

### Spinaaliset lihasatrofiat - selkäydinperäinen hermo-lihassairaus

- Werdnig-Hofmannin tauti (SMA I-II)
- Kugelberg-Welanderin tauti (SMA III)
- Aikuisiän spinaalinen lihasatrofia (SMA IV)

### Motoneuronitaudit - liikehermojen ja -solujen sairaudet

- Amyotrofinen lateraaliskleroosi (ALS/MND)
- Familiaalinen ALS (FALS)
- Spinobulbaarinen lihasatrofia - Kennedyn syndrooma (SBMA)

(Lihastautiliitto Ry 2009.)

### 2.6.2 Neuromuskulaarisairauden diagnoosi

Kliininen kuva ja suvun terveystiedot muodostavat diagnostisen toiminnan lähtökohdan. Raajalihasten kuvantamismenetelmät, magneettikuvaus ja tietokonetomografia, sekä myös lihassähkökäyrä, eli elektromyografia (EMG), auttavat löydösten paikantamisessa. Verinäytteessä seerumin kohonneet lihasentsyymipitoisuudet, kuten kreatiiniakinaasi, ja seerumissa ilmenevät autovasta-aineet asetyylikoliinireseptoria vastaan ovat tyypillisiä lihasvaurioiden merkkiaineita. Lihاسبiopsian histopatologinen tutkimus on joskus ratkaiseva ja tuo esiin diagnostiikassa keskeiset löydökset, mutta yksiselitteistä diagnoosia ei silti aina onnistuta saamaan sen avulla. Kliininen neurologinen status, muun muassa peruslihasvoima, voi olla usein normaali. Toisaalta vaikea, jatkuva lihasten heikkous voi kliinisesti ilmetä pakkoliikkeen omaisesti. Näillä liikkeillä potilas yrittää kompensoida lihasheikkoudesta johtuvaa toimintakyvyn puutetta. (Therapia Fennica 2012.)



### **3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT**

Opinnäytetyö on teoreettinen, aiheesta löytyviin lähteisiin perustuva tutkielma kliinisessä lihasbiopsiadiagnostiikassa käytetyistä ja edelleen käytössä olevista tutkimusmenetelmistä (Hirsjärvi ym. 2009).

Tavoitteena on koostaa tiivis tietopaketti käytössä olevista tutkimusmenetelmistä laboratorion ja terveydenhuollon henkilökunnalle sekä muille aiheesta kiinnostuneille. Histologisia värjäysmenetelmiä kuvattaessa käytetään esimerkkisairauksina Duchennen ja Beckerin lihasdystrofiaa.

Pää tutkimustehtävä on kliinisessä lihasbiopsiadiagnostiikassa käytettävien morfologisten tutkimusmenetelmien kuvaaminen. Opinnäytetyössä kuvataan nykyisin yleisimmin käytössä olevat tutkimusmenetelmät.

### **4 KLIINISEN LIHASBIOPSIADIAGNOSTIIKAN TUTKIMUSMENETELMIÄ**

#### **4.1 Lihasbiopsia**

Menetelmiä lihasbiopsian ottamiseen ovat avoin lihasbiopsia ja puoliavoin konkotomiabiopsia. Biopsia suositellaan tehtäväksi Weilin Blakesleyn konkotomilla (kuva 4). (TYKSLAB JA PATOLOGIA ohjekirja 2012.) Molemmissa edellä mainituissa menetelmissä iho ensin puhdistetaan antiseptisellä liuoksella ja puudutetaan adrenaliinia sisältävällä lidokaiini-injektiolla (Syväoja 2008). Puudutteen sisältämä adrenaliini supistaa verisuonia ja vähentää verenvuotoa. Tämän jälkeen tehdään lihaksen suuntaisesti viilto ihon ja lihasta peittävän fascian läpi (TYKSLAB JA PATOLOGIA ohjekirja 2012).

Avoin lihasbiopsia vaatii noin neljän senttimetrin mittaisen viillon, jonka jälkeen pala lihasta voidaan irrottaa tarttumalla pinseteillä sen toiseen päähän ja leikkaamalla se irti terävillä saksilla. Se lihaksen pää, josta tartutaan kiinni pinseteillä, on vioittunut toimenpidettä tehtäessä eikä kelpaa näytteeksi. (TYKSLAB JA PATOLOGIA ohjekirja 2012.)

Konkotomilla otettava lihasbiopsia vaatii vain noin yhden senttimetrin mittaisen viillon, jonka jälkeen pihtimäisellä instrumentilla pienellä kiertoilikkeellä irrotetaan pala hieman jännitetystä lihaksesta näytteeksi. (TYKSLAB JA PATOLOGIA ohjekirja 2012.)



Kuva 4. Konkotomiabiopsia (Muokattu: BioMed Central 2010).

Lihاسبiopsia voidaan ottaa myös Bergströmin menetelmää käyttäen, mutta sitä käytetään lähes ainoastaan tutkimustyössä. Iho puhdistetaan ja puudutetaan kuten edellisten menetelmien kohdalla ja ihon läpi viedään halkaisijaltaan viiden millimetrin näyteneula. Näytettä kerätään neulaan ihon alta lihaskudoksesta ja tämän jälkeen näyte puhdistetaan näkyvästä rasva- ja sidekudoksesta sekä verestä. (Syväoja 2008.)

Biopsia tarkoittaa näytteen ottamista elävästä kudoksesta ja sen tarkastusta (Pesonen & Ponteva 1980). Lihاسبiopsia tarkoittaa lihaksesta otettua kudoksenäytettä (Koistinen 1991). Biopsian kohde tulisi valita kliinisen tutkimuksen ja elektromyografian perusteella. Kohde ei saa olla liian surkastunut, vaan kohtalaisesti vioittunut eli affisoitunut lihas. Biopsiaa ei pidä ottaa siitä kohdasta, jossa elektromyografianeula on ollut tai kohdasta johon on annettu injektio lihakseen. Näitä kohtia tulisi välttää tulehdusmuutosten ehkäisemiseksi lihasbiopsiassa. Näytepalaa tulee käsitellä varoen, koska kovakourainen käsittely saattaa vaurioittaa lihasbiopsianäytettä (artefakta). Näytepalat asetetaan tuoreina petrimaljalle, jonka pohjalla on fysiologisella keittosuolaliuoksella (0,9% natriumkloridi (NaCl)) kostutettu imupaperi estämässä kuivumista. Ylimääräinen neste pitää kaataa pois koska näyte ei saa olla nesteessä. (TYKSLAB JA PATOLOGIA ohjekirja 2012.) Tämän jälkeen näyte toimitetaan välittömästi neuropatologian laboratorioon (jäämurskeessa), jossa suoritetaan näytteen jatkokäsittely.

Näytteen lihassyiden orientaatio määritetään ennen jäädyttämistä stereomikroskoopin avulla. Lihassyiden tulee olla pystysuunnassa, kun näyte asetellaan korkin palalle, joka toimii näytteen alustana sitä jäädytettäessä. Korkinpalalla on pieni määrä muovipohjaista tukiainetta (Optimal Cutting Tissue Compound (OCT)), jonka avulla näyte saadaan pysymään pystysuunnassa (poikkileikkaus). Jäädytys tapahtuu välittömästi orientaation jälkeen nestetyyppellä jäädytetyssä isopentaaniliuoksessa (Syväoja 2008.) Orientaation säilyminen on tärkeää, jotta näytteestä voidaan mikroskooppisesti määrittää lihasolujen pinta-ala sekä lihassolujakauma. Jäädytyksen tulee olla nopeaa, ettei näytteeseen synny kiteitä. Näytteen jäädyttäminen liian matalassa lämpötilassa

(-20 °C) ja liian korkeassa lämpötilassa (nestetyppi, -195 °C) aiheuttaa näytteelle soluvaurioita. (TYKSLAB JA PATOLOGIA ohjekirja 2012.) Jäädymisen jälkeen näytteet kuljetetaan nestetyypessä säilytettäväksi -80 °C:teen pakkaseen ennen varsinaisia analyysejä (Syväoja 2008).

Lihاسبiopsianäytteistä leikataan ennen värjäystä kryostaatilla (jääleikelaite) objektilasille 10 µm:n paksuisia leikkeitä -24 °C:ssa entsyymi- ja histokemiallisia tutkimuksia varten sekä 6-8 µm:n paksuisia leikkeitä immunohistokemiaa varten (Syväoja 2008).

## 4.2 Genetiikka

Lihasperäisten lihastautien ryhmästä useimmat lihastaudit ovat perinnöllisiä. Monet sairauksia aiheuttavista perintötekijöistä on paikannettu kromosomistoon ja niistä monen geenivirhe tunnetaan jo tarkkaan. Lihasdystrofoissa tämä geenivirheestä syntynyt virheellinen proteiini on useimmissa tapauksissa lihaskudoksen solukalvon rakennetekijä. (Therapia Fennica 2012.) Esimerkiksi lihassolukalvon sisäpuolella sijaitsevan dystrofiiniproteiinin avulla solukalvo kestää mekaanista rasitusta lihassupistuksen aikana. Geenivirheestä johtuva dystrofiinin puuttuminen heikentää solukalvoa ja aiheuttaa lihassolun tuhoutumisen. (Sariola ym. 1992.)

Duchennen ja Beckerin lihasdystrofiat periytyvät X-kromosomissa peittyvästi ja ilmenevät vain pojilla. Beckerin lihasdystrofia on Duchennen lihasdystrofian kaltainen sairaus, mutta ilmenee vasta myöhemmällä iällä ja etenee hitaammin. (Therapia Fennica 2012.) Geeniä vastaava proteiini, dystrofiini, puuttuu tai on kooltaan normaalia pienempi (Sariola ym. 1992).

Tautienkantajat on usein mahdollista tunnistaa veren valkosolujen DNA-hybridisaatiolla tai polymeerasiketjureaktiolla. Syntymää edeltävässä diagnostiikassa käytetään edellä mainittujen menetelmien lisäksi geenien kytöntäanalyysiä. (Sariola ym. 1992.)

Deleetio (häviämä), duplikaatio (kahdentuma) ja piste- (yhden nukleotidin muutos) sekä pienet mutaatiot geenissä ovat tyypillisiä Duchennen lihasdystrofiaa sairastavalla potilaalla (Neuromuscular Home Page 2012). Laajat deleetiot geenissä havaitaan DNA- eli Southern blot-hybridisaatio- tai polymeraasiketjureaktiomenetelmää käyttämällä (Sariola ym. 1992; Neuromuscular Home Page 2012). Piste- ja muut pienet mutaatiot geenissä havaitaan geenin sekvensoinnilla (Neuromuscular Home Page 2012).

In situ-hybridisaatio on merkittävä menetelmä tutkittaessa geenien ilmentymistä soluissa ja niiden perusteella valmistettavien proteiinien merkitystä solujen sekä kudoksen toiminnassa. Tässä menetelmässä radio- tai fluoresoivalla (valoa synnyttävä) merkkiaineella merkityjä nukleotideja kytketään yksijuosteiseksi koettimeksi, deoksiribonukleiinihapoksi (DNA) tai ribonukleiinihapoksi (RNA), ja näitä käytetään paikantamaan komplementaarista lähettiribonukleiinihappoa (mRNA) kudostenleikkeessä. Inkuboimalla näytettä ja koettimia yhdessä yksijuosteiset koettimet yhdistyvät näytteessä olevan mRNA:n kanssa emäspariutumissääntöä noudattaen. Radio- tai fluoresoiva merkkiaine saa aikaan mikroskoopissa näkyvän muutoksen. (Wilcox, 2000.)

Suuri määrä potentiaalista tietoa katoaa erotettaessa nukleiinihapot kudoksen soluista, kuten esimerkiksi PCR-menetelmiä käytettäessä. In situ-hybridisaation etu on herkkyys, koska sillä pystytään osoittamaan kudostenleikkeestä jopa yksittäisen solun sisältämä mRNA ja kokonaista kudostenleikettä tarkasteltaessa pystytään tarkkaan määrittämään mRNA:a sisältävä solu- ja kudostyyppi. Yhteen hybridisaatioon voidaan kerralla lisätä useita eri koettimia ja valmisteet säilyvät myös hyvin mahdollistaen niiden tutkimisen pitkänkin ajan kuluttua. (Wilcox, 2000.)

## 4.3 Mikroskopia

### 4.3.1 Histokemialliset värjäysmenetelmät

Histokemiallisissa värjäysmenetelmissä kudokset värjäytyvät kemiallisten ominaisuuksiensa perusteella eri väriaineilla. Histokemiallisten

värjäysmenetelmien perusteella tulisi pystyä erottamaan toisistaan normaali ja epänormaali lihas. Lisäksi tulisi pystyä määrittämään onko kyseessä minimaalinen vai huomattava patologinen muutos sekä onko se laajalle levinnyt vai paikallinen. (Dubowitz & Sewry 2007.)

Hematoksyliini-eosiini- (HE) värjäys on yleisin histokemiallinen värjäysmenetelmä, jossa hematoksyliini toimii tumavärinä ja eosini värjää muun muassa eosinofiilejä, lihasta ja sidekudosta (Naukkarinen, 2000). Lihaksen HE-värjäyksessä sidekudos ja lihaskudos erottuvat punaisen eri sävyinä ja esimerkiksi regeneroituva lihassolu erottuu sinertävänä sen kiihtyneen mRNA-synteesin vuoksi (Neuromuscular Home Page 2012). Gomori trichrome-värjäysmenetelmällä kollageeni värjäytyy siniseksi, hermo ja lihas punaiseksi ja elastiini pinkiksi tai keltaiseksi (Jones, 2010). Värjäystä käytetään lihaksen, sidekudoksen ja fibriinin erotteluun ja sitä voidaan käyttää myös eri tyyppisten myopatioiden tunnistamiseen (Neuromuscular Home Page 2012).

HE-värjäys on yleisvärjäys ja sen ansiosta varhaisiin patologisiin löydöksiin Duchennen lihasdytrofiassa kuuluu muun muassa fagosytoosi, jolloin runsaasti makrofageja kertyy nekroottisten kudosten ympärille. HE-värjäyksessä voidaan havaita edellä mainitun lisäksi myös lukuisia epäkypsiä lihassyitä. Myöhäisempiä patologisia löydöksiä Duchennen lihasdystrofiassa ovat endomysiumin fibroosista ja rasvoittumisesta johtuva paksuuntuminen, lihassyiden koon vaihtelu, pienten lihassyiden pyöreä muoto ja useiden lihassyiden ylisupistuminen. Nämä löydökset tulevat esiin sekä Gomori trichrome- että HE-värjäysmenetelmillä. (Neuromuscular Home Page 2012.)

#### 4.3.2 Entsyymihistokemialliset tutkimukset

Substraatit ovat yhdisteitä, jotka reagoivat soluissa tai kudokseteissa metabolisesti aktiivisina esiintyvien entsyymien kanssa. Lihasbiopsia tulee lähettää tuoreena laboratorioon, sillä fiksoidusta, eli kiinnitetystä näytteestä ei voida osoittaa sen entsyymiaktiivisuutta. Tämän vuoksi entsyymihistokemiallinen tutkimus tehdään jääleikkeestä. Tutkittavia kudokseteitä inkuboidaan substraatin läsnä ollessa. Syntyvä reaktiotuote

saadaan mikroskoopissa näkyväksi reaktioon lisätyn väriaineen avulla, joka saostuu entsyymien esiintymiskohtaan. (Solunetti 2006.)

Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi- (NADH) tetrazolium reduktaasi-värjäysmenetelmällä tutkitaan mitokondrioiden NADH-dehydrogenaasin entsyymiaktiivisuutta. Varhaiset patologiset löydökset Duchennen lihasdystrofiassa ovat muun muassa nekroottisten lihassyiden kasaantuminen. Tämä näkyy valomikroskoopissa kalpeina, heikosti värjäytyneinä alueina NADH-värjäyksessä. (Neuromuscular Home Page 2012.) Sukkinaattidehydrogenaasi-sytokromi-C-oksidaasi (SDH-COX) värjäysmenetelmällä voidaan tutkia mitokondrioiden toimintahäiriötä osoittamalla SDH:n ja COX:n aktiivisuutta ja paikantumista lihassyissä, esimerkiksi mitokondriaalisissa myopatioissa. Duchennen lihasdystrofialle tyypillinen lihassyiden uudismuodostus ja niiden myopaattinen kasaantuminen on havaittavissa adenosiinitrifosfaasi- (ATPaasi) värjäysmenetelmällä pH:ssa 4,3 sekä acid että alkaline phosphatase-värjäysmenetelmällä. Myös lukuisia epäkypsiä lihassyitä voidaan havaita alkaline phosphatase- ja ATPaasivärjäysmenetelmällä pH:ssa 4,3. Myöhäisempiä patologisia löydöksiä ovat muun muassa endomysiumin fibroosista ja rasvoittumisesta johtuva paksuuntuminen, lihassyiden koon vaihtelu, pienten lihassyiden pyöreä muoto ja useiden lihassyiden ylisupistuminen. Edellä mainitut löydökset tulevat esiin acid ja alkaline phosphatase-värjäysmenetelmillä. Beckerin lihasdystrofialle tyypillinen lihassyiden myopaattinen kasaantuminen ja nekroottisten lihassyyklusterien korvautuminen esteraasipositiivisilla soluilla on havaittavissa esteraasivärjäysmenetelmällä. (Neuromuscular Home Page 2012.)

#### 4.3.3 Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät

Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät perustuvat vasta-aineen tai vasta-ainekompleksin sitoutumiseen antigeeniinsä. Merkkiaineet liitetään sellaisenaan vasta-aineeseen leimaamalla ne suoraan (suora menetelmä) tai käyttämällä monivaiheista leimausta (epäsuora menetelmä). Epäsuora menetelmä on suoraa menetelmää huomattavasti herkempi ja soveltuu käytettäväksi

useimmissa kliinisissä värjäyksissä. Värjäys voidaan tehdä joko käsin tai koneellisesti. Käytetyimpiä menetelmiä ovat avidiini-biotiinimenetelmät (leimattu avidiini-biotiinimenetelmä (LAB)) ja avidiini-biotiinikompleksimenetelmä (ABC) tai värjäysautomaattiin suoraan hankittavat reagenssit. Polymeeritekniikassa hyödynnetään myös epäsuoraa menetelmää ja sen etuna on, että värjäystä ei häiritse endogeeninen biotiini. Yleisimmin kliinisessä käytössä olevat värjäykset perustuvat entsyymaattiseen reaktioon. Useimmiten näissä käytetään merkkiaineena entsyymiä. Yleisin merkkiaine on piparjuuren peroksidaasi (HRP). Substraattina toimii vetyperoksidi ja kromogeeninä on useimmin ruskean sakan muodostava 3,3'-diaminobentsiinitetrahydrokloridi (DAB), jolloin reaktio saadaan mikroskoopissa näkyväksi. Joskus käytetään myös punaisen värin antavaa 3-amino-9-etyylikarbatsolia (AEC). Leimaamiseen on mahdollista käyttää myös fluoresoivia merkkiaineita. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998.) Lihasbiopsiat värjätään jääleikkeistä, joten niiden immunoreaktiivisuus säilyy ja antigenein paljastusmenetelmiä ei tarvitse käyttää.

Immunohistokemiallisia määryksiä tehdään muun muassa sytoplasmassa ja tumakalvolla sijaitseville proteiineille ja sarkomeerin proteiineille. Uusimpia immunohistokemian avulla löydettyjä tauteja on peittyvästi periytyvä myosinopatia (MYH2 (nopea myosiinin raskasketju puuttuu)), joka löydettiin myosiinin immunohistokemiallisen kaksoisvärjäyksen avulla. (Tajsharghi ym. 2010.)

Immunohistokemiaa on käytetty jo aiemmin Duchennen ja Beckerin lihasdystrofioiden tunnistamisessa. Normaalisti dystrofiini ympäröi lihassolun reunoja plasmamembraanin alla ja värjäytyy lihassyyn reunalla helminauhamaisesti immunohistokemiallisessa värjäyksessä dystrofiinin eri osia vastaan tehdyillä vasta-aineilla. Dystrofiinin puutos on tyypillistä Duchennen ja Beckerin lihasdystrofiolle. Edellä mainittu muutos on mahdollista tunnistaa myös Western blot- menetelmän avulla. (Sariola ym. 1992.)



## 5 OPINNÄYTETYÖN TULOKSET

Tutkimusmenetelmät ovat lihasbiopsian mikroskooppitutkimusta varten tehtäviä kudoksen histologisia värjäyksiä, jotka voidaan jakaa histokemiallisiin, entsyymihistokemiallisiin ja immunohistokemiallisiin värjäysmenetelmiin. Edellä mainitut värjäysmenetelmät ovat esitelty valittujen esimerkkisairauksien pohjalta. Esimerkkisairauksiksi tässä opinnäytetyössä on valittu Duchennen ja Beckerin lihasdystrofiat.

Lihaskudoksen tutkimisessa voidaan käyttää in situ-hybridisaatiota tutkittaessa geenien ilmenemistä ja niiden tuottamien proteiinien vaikutusta solun toimintaan. Myös muita genetiikan tutkimuksia, jotka eivät välttämättä vaadi lihasbiopsiaa tutkimusmateriaaliksi, on käsitelty yleisellä tasolla.

## 6 POHDINNAT

Opinnäytetyössä on päästy lähes tavoitteeseen ja siinä on kuvattu sekä vanhempia että maassamme yleisimmin käytössä olevia lihasbiopsian tutkimusmenetelmiä ja tuotettu niistä tiivis tietopaketti laboratorion ja terveydenhuollon henkilökunnalle sekä muille aiheesta kiinnostuneille.

Opinnäytetyö käsittelee lihasbiopsian tutkimuksia enemmän lääketieteellisestä kuin bioanalyytikon työn näkökulmasta, joka ei ollut tavoitteiden mukaista. Opinnäytetyö on metodologiselta lähtökohdaltaan kvalitatiivisesti toteutettu tutkielma.

Oppimisen kannalta katsottuna opinnäytetyön hyöty on patologian syventävien opintojen suorittaneelle opiskelijalle sen tekoprosessissa käytettyjen lähteiden tutkimisesta kertynyt tietous histologisista kudostvärjäysmenetelmistä. Tämän tiedon vieminen mukana työelämään tukee varmasti opinnäytetyön tekijän ammattitaitoa.

Tässä opinnäytetyössä esitettävien tulosten ja tietojen luotettavuutta puoltavat laadukkaiden, vaikka ei ehkä yleisesti tieteellisessä työssä hyväksyttävien, lähteiden käyttö ja niiden valinnassa käytetty harkinta. Vaikka osa lähteistä on vanhoja, ei niiden sisältämä asia ole muuttunut. Nämä edellä mainitut vanhat lähteet sisältävät lähinnä anatomiaan liittyvää tietoa. Lisäksi tietojen luotettavuuden puolesta puhuu työelämän opinnäytetyön ohjaajalta saatu asiantunteva ohjaus.

Jatkotutkimuksen tai seuraavan opinnäytetyön aiheeksi tähän liittyen voisi ajatella ainakin päivitystä lihasbiopsiadiagnostiikan tutkimusmenetelmiin tulevina vuosina uusia menetelmiä käyttöön otettaessa. Lisäksi aihetta voisi laajentaa koko histologian alueelle osittaen sen tutkimusmenetelmiin kudostyypeittäin, esimerkiksi munuaisbiopsiadiagnostiikan tutkimusmenetelmät. Jatkotutkimuksessa tai tulevassa opinnäytetyössä voisi käsitellä joko moderneja, perinteisiä tai jopa antiikkisia tutkimusmenetelmiä tai se voisi yhdistellä kaikkia edellä mainittuja.

## LÄHTEET

Auvinen, S., Vilhola, A., Krahe, R., Kupila, J., Hackman, P., Hietaharju, A., Udd, B. 2003. Uudentyyppinen myotoninen dystrofia. *Duodecim* 8/2003. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Biomedcentral, BMC Geriatrics. Viitattu 30.6.2012 <http://www.biomedcentral.com/1471-2318/10/43/figure/F2?highres=y>.

Dubowitz, V. & Sewry, C. A. 2007. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. 3. painos. Lontoo: Saunders Elsevier.

Sariola, H., Koistinen, H., Wallgren-Pettersson, C., Rapola, J. 1992. Dystrofiinin tutkimus lihasdystrofiassa – miksi ja milloin? *Duodecim* 6/1992. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Hiltunen, E., Holmberg, B., Jyväsjärvi, E., Kaikkonen, M., Lindblom-Yläne, S., Nienstedt, W., Wähälä, K. 2005. *Galenos: Ihmiselimitys kohtaa ympäristön*. 6. uudistettu painos. Helsinki: WSOY.

Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. *Tutki ja kirjoita*. 15. uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Internetix. Internetix-materiaali Opit-ympäristöön. Viitattu 12.12.2012 <http://materiaalit.internetix.fi/fi/opintojaksot/5luonnontieteet/biologia/geenitekniikka/pcr>.

Jones, M. 2010. *Mastering the trichrome stain*. Dako Connection 14/2010. California: Carprinteria.

Koistinen, P. 1991. *Lihasoppi*. Helsinki: Koulutusaineisto/TUL.

Lihastautiliitto Ry. *Lihastaudit*. Viitattu 22.4.2012 <http://www.lihastautiliitto.fi/Lihastaudit>.

Mahon, M., Toman, A., Willan, P.L., Bagnall, K.M. 1984. Variability of histochemical and morphometric data from needle biopsy specimens of human quadriceps femoris muscle. *Journal of the Neurological Sciences* 63/1984.

Matikainen, M. 2001. *Genetic Epidemiology of Hereditary Prostate Cancer in Finland*. Väitöskirja. Tampere: Tampereen yliopisto.

Naukkarinen, A. 2000. *Histologiset värjäykset*. Moodi 4-5/2000. Kokkola: Art-Print.

Naukkarinen, A. & von Boguslawsky, K. 1998. *Immunohistokemia*. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) *Biologinen valomikroskopia*. Helsinki: Yliopistopaino.

Neuromuscular Home Page. Viitattu 9.11.2012 <http://neuromuscular.wustl.edu/>.

Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A., Björqvist, S. 2009. *Ihmisen anatomia ja fysiologia*. 18. uudistettu painos. Helsinki: WSOY.

Pesonen, N. & Ponteva, E. 1980. *Lääketieteen sanakirja*. Porvoo: WSOY.

Solunetti. Viitattu 13.11.2012 <http://www.solunetti.fi/>.

Somer, H. & Auranen, M. 1997. Lihastautien geenivirheet. Duodecim 18/1997. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim.

Suominen, I. & Ollikka, P. 2006. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3. painos. Opetushallitus.

Staron, R.S., Hagerman, F.C., Hikida, R.S., Murray, T.F., Hostler, D., Crill, M.T., Ragg, K.E., Toma, K. 2000. Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 48/2000.

Syväoja, H. 2008. Lihassolutyyppin vaikutus kehon rasvakudoksen määrään nuorilla ja vanhoilla miehillä. Kandidaatintutkielma. Jyväskylä: Jyväskylän yliopisto.

Tajsharghi, H., Hilton-Jones, D., Raheem, O., Saukkonen, A., Oldfors, A., Udd, B. 2010. Human disease caused by loss of fast IIA myosin heavy chain due to recessive MYH2 mutations. Brain 133/2010.

Therapia Fennica. Lihastaudit. Viitattu 22.4.2012  
<http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Lihastaudit>.

TYKSLAB JA PATOLOGIA ohjekirja. Erikoisalakohdittaiset tutkimushakemistot. Patologia. M-  
 lihaksen histologinen tutkimus. Viitattu 9.12.2012  
<http://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/4057.html>.

Udd B. 2007. Lihastautien diagnostiikka tarkentuu – potilaita Suomessa yli 10 000. Suomen Lääkärilehti 6/2007.

Udd, B. 2011. Lihastautiliiton konferenssi: Lihastautien kehittyvä tutkimus ja hoito. Tamperetalo. Tampere. 16.- 17.11.2011. Saatavissa myös <http://www.lihastautiliitto.fi/t/39005103.pdf>.

Walker, J.M. 2005. Electrophoretic techniques. Teoksesta Wilson, K. & Walker, J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 6. painos. New York: Cambridge University Press.

Wilcox, J. 2000. Year 2000 meeting of the histochemical society: Workshop – Visualizing neoplasia; overview of in situ hybridization methodology. Atlanta. Emory university. Saatavissa myös <http://www.histochem.org/archives/review-082000-ish.pdf>.