

# Muskelbiopsi og mitokondriesykdom

Laurence Bindoff



UNIVERSITETET I BERGEN



European  
Reference  
Network



## Overview

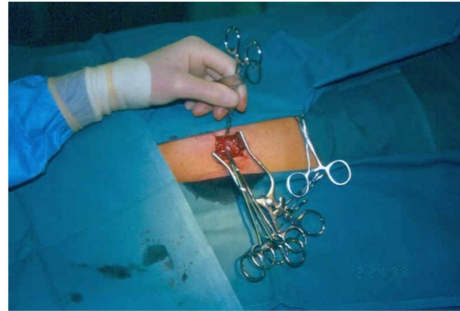
- Indications for biopsy (when investigating mitochondrial disease!)
  - Clinical features
- Are there quicker ways to the diagnosis
  - New genetic methods are reducing the need for biopsy
- How should the muscle biopsy be handled
- What can we get out of a muscle biopsy
  - Morphology, histochemistry
  - Biochemical analyses
  - mtDNA analysis

## Choice of tissue for diagnosis

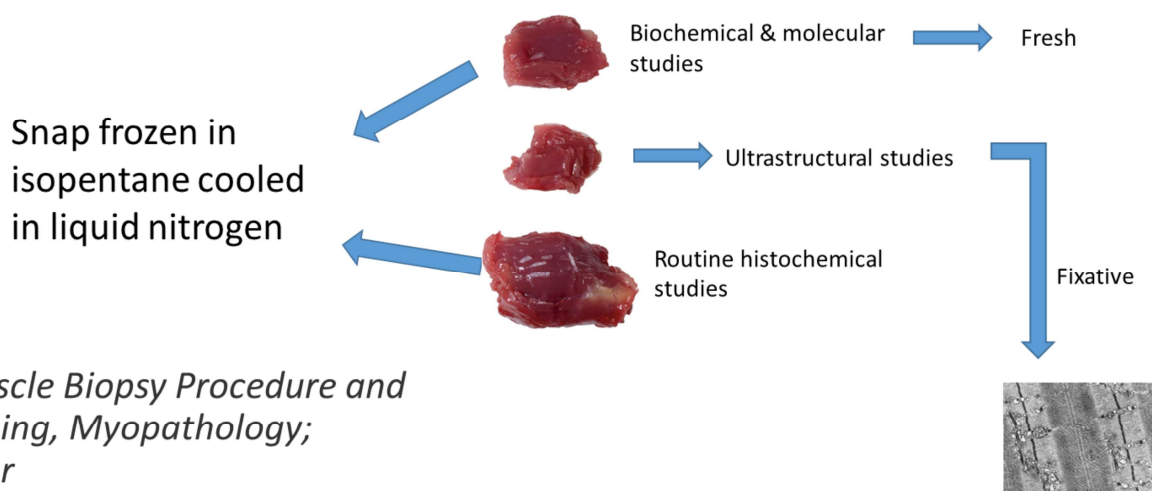
- Remember
  - Nuclear gene defects are usually (but not 100%) identifiable in blood cells!
- The most common reasons for needing tissue are:
  - A baby/child with a complex syndromic phenotype
    - AND genetics have not helped
  - You suspect a tissue restricted mtDNA mutation
    - mtDNA mutations can segregate to ONE or FEW tissues
      - Single mtDNA deletions (Kearns-Sayre, CPEO etc.)
      - Even common mtDNA point mutations
    - Usually the disease involves skeletal muscle so biopsy relevant
      - BUT - Remember **urine** can be a good alternative
- The most common tissue used to biopsy is skeletal muscle
  - Other tissues are problematical
    - e.g. we often do not have a controls for biochemical studies

## Muscle biopsy - how?

- Det finnes flere metoder for å ta muskelbiopsi. Valget avhenger av personlig preferanser, hvor mye vev en må ha og ekspertisen tilgjengelig.
- Nål eller conchotome teknikker gir mengde vev som vil være tilstrekkelig til flere analyser men krever at man gjøre det selv. De fleste velger å få hjelp av en kirurg og de tar oftest åpen (til høyre) muskelbiopsier. Fordel med nål biopsi er det er mindre invasivt og pasienten kan reise hjem etter noen timers observasjon. Åpen biopsi krever at man kontrollerer koagulasjonsstatus til pasienten og holder pasienten lenge på sykehus.
- Når man ser på hva man skal bruke biopsien til, må man huske at biokjemiske analyser krever mer en mikroskopiske og genetiske analyser. Man må derfor tar nok til planlagt undersøkelser.



## How is the muscle biopsy handled?

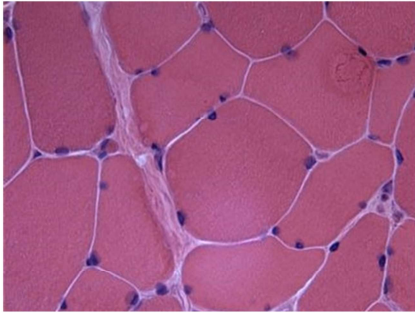


Alle undersøkelser på en muskelbiopsi med spørsmål om mitokondriesykdom foretas på fersk-frosset vev. Kun elektronmikroskop (EM) analyse krever fiksasjon (og EM er kanskje den minst verdifulle av undersøkelsene). Vev nedfryses ved å legge den i en løsemiddel (isopentan) som er nedkjølt i flytende nitrogen. Dette gir bra morfologi og bevare enzymaktiviteter.

Hva biopsien deretter brukes til avhenger av spørsmål reist av kliniker. Alle først blir det kjørt mikroskopiske analyse for å se på morfologi og enzymaktiviteter.

## Routine histochemical studies

- Standard stains performed on «frozen» muscle
  - **H&E, ATPase (pH 9,4; 4,3; 4,6)**, NADH, SDH, COX, Gomori, PAS, Oil red O

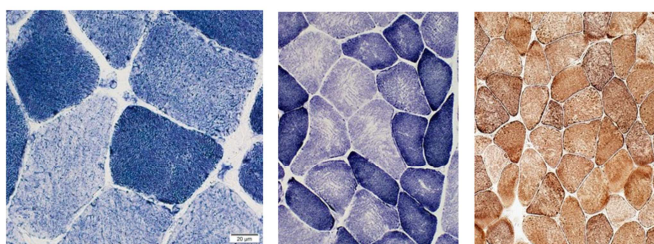


H&E

Rutine undersøkelser inkluderer HE (hematoksylin + Eosin) for morfologi; ATPase som viser fibertyper (hoved type I og II); NADH og Gomori som viser mitokondrienes distribusjon og SDH og COX som er spesifikke mitokondriefarginger.

## Histochemical stains relevant for mitochondria

- Standard stains
  - NADH, SDH, COX, Gomori, PAS, Oil red O (se: <https://neuromuscular.wustl.edu/>)



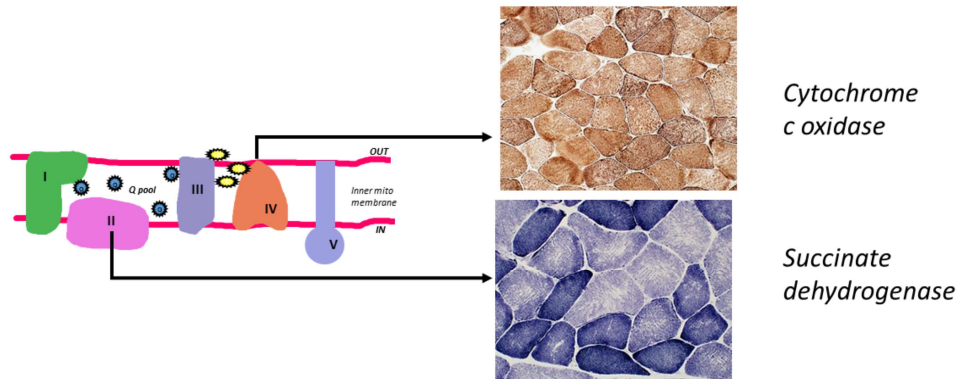
NADH

SDH

COX

NADH og Gomori viser forskjellige aspekter men i forhold til mitokondriesykdomsdiagnose viser begge stort sett hvor mitokondriene befinner seg innen muskelfiberen og om det finnes akkumulering av mitokondrier. PAS farge for glykogen og oil red O for fett. PAS og oil red farginger kan ses på <https://neuromuscular.wustl.edu/>

## Specific mitochondrial stains



Succinate dehydrogenase (SDH) og cytochrome oxidase er spesifikt for mitokondrie og respirasjonskjeden. SDH er en del av respirasjonskjede complex II mens COX er complex IV.



## Electron microscopy

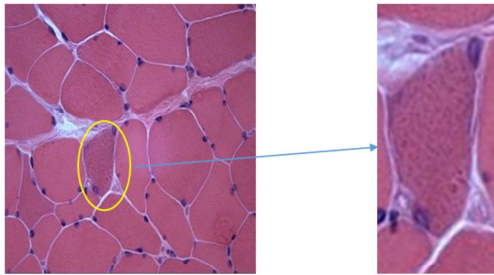


*Bindoff*

Eksempler på mitokondrielle  
inkludjoner kan finnes på  
<https://neuromuscular.wustl.edu/>

Elektron mikroskopi viser ultrastruktur av vevet men forandringer som tidligere har vært mistenkt som spesifikt for mitokondriesykdom som «parking-lot» inkludjoner o.l., er ikke spesifikke og kan finnes hos flere andre sykdommer.

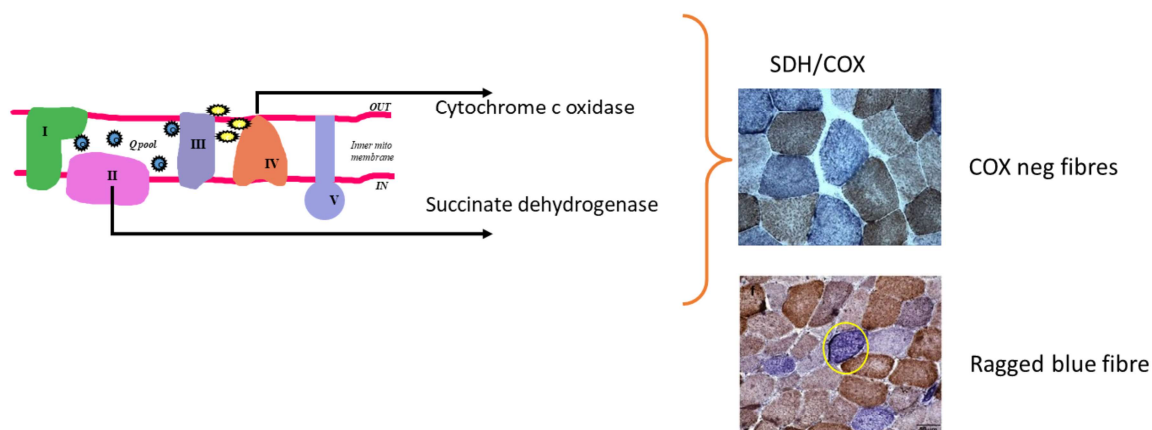
## Mitochondrial pathology



H&E

Viser en muskelfiber som viser mitokondrie akkumulering allerede ved HE farging

## Mitochondrial pathology



Ragged red fibre (se: <https://neuromuscular.wustl.edu/>) og EM avvik ble tidligere brukt som klassisk tegn til mitokondriesykdom. Disse er lite spesifikt og ses ved andre sykdomsprosesser. Mitokondrie akkumulering ses enkelt og spesifikt ved SDH og COX farging (også NADH) – ser SDH midtre bilde. Manglende COX aktivitet (asterisk) vises med COX farging men ses lettere når man kombinerer SDH og COX farginger da disse fibre viser en ren blåfarge.

Når en kombinert SDH og COX farging viser en mosaikk av mange COX negative og positive fibre forteller det 2 viktige ting: 1. at pasienten har sikkert en mitokondriesykdom og 2. at sykdommen oppstår pga., defekt mtDNA (men det skiller ikke mellom en primær mtDNA defekt (som singel delesjon eller punkt mutasjon som 3243A>G) og en sekundær defekt som multiple mtDNA delesjoner eller mtDNA deplesjon som

forårsakes av kjernegendefekter.

## Some traps - myositis

- Ved myositt og særlig inklusjonslegeme myositt men også polymyositt kan man se flere "mitokondrie avvik inkl. ragged-red fibre og COX negative fibre. Også EM avvik i form av inklusjoner.
- Se
  - 1. Mitochondrial abnormalities in inclusion-body myositis. Oldfors, A. R. et al. doi.org/10.1212/01.wnl.0000192127.63013.8d
  - 2. Mitochondrial pathology in inclusion body myositis. Lindgren, et al. Neuromuscular Disorders DOI: 10.1016/j.nmd.2014.12.010
- Mitokondrie avvik ses også ved myopatier som myofibrillær myopati
  - Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. Vincent AE, et al. Neuromuscul Disord. 2016 Oct;26(10):691-701.

## Impact of age/biopsy site

- Alder affiserer muskel og man kan se COX negative fibre hos elder mennesker (fra 40 år oppover!). Da må man tolke biopsi funn forsiktig.
  - Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. Pesce et al. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 30, No. 11, pp. 1223–1233, 2001
- Valg av muskel som brukes til biopsi blir også viktig. Noen muskel f.eks. paraspinale muskler er veldig type 1 og har mange mitokondrier. Derfor kan de viser økt fett og tegn til mitokondrie opphopning som reiser spørsmål om RRF.
  - [BMC Neurology](#) 15(1):114

## Oppsummering

- Selv om genetikken spiller en økende rolle, er muskelbiopsi fortsatt en viktig del av utredning på pasienter med mistenkt mitokondriesykdom
- Valg av muskel og riktig håndtering er svært viktig
- Histokjemiske farginger fanger viktige endringer og her gjelder det særlig SDH og COX farging
- Husk at alder kan gjøre det vanskelig med tolking av manglende COX aktivitet
- Muskel kan også være et viktig kilde for genetisk analyser særlig hos pasienter med mtDNA mutasjoner som ikke finnes på blod