

Fredrik Ponten, docent, överläkare, institutionen för genetik och patologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala

Karin Tømmerås, postdoktorstipendiat, institutt for laboratoriemedisin, avdeling for morfologi, Universitetssykehuset i Trondheim, Norge

Erik Larsson, professor, överläkare, institutionen för genetik och patologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala, institutt for laboratoriemedisin, avdeling for morfologi, Universitetssykehuset i Trondheim, Norge

Bättre sjukdomsbild i framtiden med laserbaserad mikrodisektion

■ Målet med diagnostik av sjukdomar är att kunna ge en så exakt diagnos och prognos av aktuella förändringar att de möjliggör den mest effektiva behandlingen och uppföljningen. Att nå detta mål är svårt eftersom en hörnsten och förutsättning för diagnostik av många sjukdomar, inklusive nästan alla tumörsjukdomar, är mikroskopisk undersökning av vävnad och celler. Alla som arbetar med eller har arbetat med mikroskopisk undersökning av sjuk vävnad vet att den mikroskopiska bilden kan uppvisa en stor variation (heterogenitet). Det som används som ett entydigt sjukdomsbegrepp eller en entitet kan inom sig rymma ett variabelt spektrum av histologiska förändringar. Denna variation sammantaget med att diagnostiker tolkar bilder olika medför svårigheter att i vissa fall nå en säker diagnos. Dock är mikroskopisk undersökning av vävnadssnitt färgade med histokemiska och immunhistokemiska metoder fortfarande den i särklass bästa metoden att säkerställa en korrekt diagnos.

Modern teknik möjliggör redan idag analys av genetiska förändringar, vilket medför att ytterligare information kan läggas till den rent morfologiska. Genom tillägg av genetisk information kommer bland annat betydelsen av heterogenitet att kunna kartläggas. Framtidens behandling av sjukdomar, exempelvis tumörer, kommer med all sannolikhet att kräva en förfinad analys av såväl geno- som fenotyp för att kunna skraddarsy en optimal behandling samt att följa effekterna av dessa.

En tumör byggs upp av olika celltyper, dels malignt transformerade celler, dels stödjevävnad (stroma), blodkärl och inflammatoriska celler. I vissa former av cancer utgörs endast en liten del av tumören av malignt transformerade (genetiskt förändrade) »tumörceller«. Att bena upp olika ingående komponenters bidrag i sjukdomsprocessens initiering och progression kan av allt att döma endast göras genom att ingående delkomponenter analyseras separat.

Det finns således ett behov av tekniker och apparatur som klarar av att analysera såväl heterogenitet som aktivitet i olika tumörbeståndsdelar. Förutom tumörsjukdomar torde det även finnas ett intresse av att kunna analysera de olika cellpopulationer som utgör grunden för olika inflammatoriska och degenerativa sjukdomar. Vi bedömer att de nya instrument för mikrodisektion som nu finns tillgängliga i kombination

SAMMANFATTAT

De senaste årens ökade kunskaper om arvsmassans struktur och betydelsen av förändringar i denna har ökat intresset för att kunna analysera genuttryck i olika delar av såväl sjuk som frisk vävnad.

I denna artikel pekar vi på möjligheter att uppnå detta med laserbaserad mikrodisektion.

Med denna teknik kan definierade cellpopulationer och även enskilda celler isoleras och analyseras.

Mikrodisekerat material blir fritt från tillblandning av omgivande celler och kan specifikt uppsamlas för analys med modern molekylärbiologisk teknik.

Av dessa tekniker kan nämnas genamplifiering och sekvensering, realtids-PCR och olika array-tekniker.

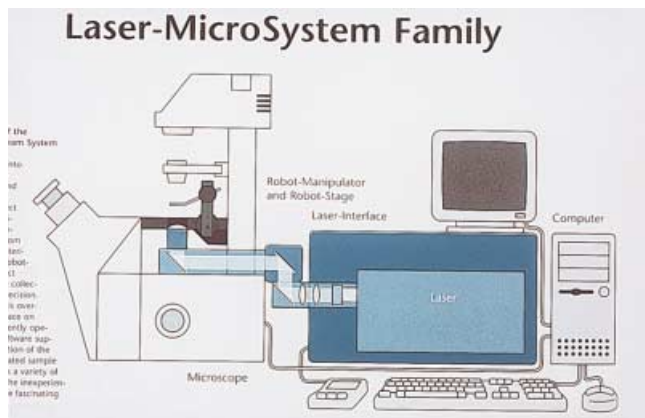
Tveklöst kommer kombinationen av dessa teknologier att få stor användning inom såväl grundforskning som mera kliniskt applicerad forskning och i framtiden bli en del av den kliniska vardagen.

med moderna tekniker för analys av DNA och RNA möjliggör denna typ av analyser.

Mikrodisektion – en ny och gammal teknik

Så kallad manuell mikrodisektion, det vill säga mikrodisektion med hjälp av en skalpell eller nål, har utförts på celler och vävnader under lång tid inom medicinsk forskning. För vissa ändamål är denna teknik tillräcklig, till exempel då större enheter som en hel körtellobulus eller hel slemhinna skall fridisekeras. Då behovet av mer rena cellpopulationer vuxit fram under senare år har mikrodisektion även fått en ökad betydelse inom tumörforskningen.

Emellertid är manuell mikrodisektion en tidsödande pro-



Figur 1. Uppställningen av PALM-systemet visar schematiskt de fyra ingående enheterna: mikroskop, laser, mikromanipulator och dator.

cess där man alltid riskerar att få tillblandning av icke önskvärda celltyper. Tillblandning av olika celltyper kan bli ödesdiger och ge falska resultat om materialet används för analyser som använder känslig PCR(polymeraskedjereaktion)-metodik.

Redan för mer än 20 år sedan utvecklade gruppen kring Meier-Ruge i Basel ett UV-laserbaserat mikropreparationsinstrument som gjorde det möjligt att skära tunna skivor eller enstaka celler från fryst vävnad [1, 2]. Emellertid gav denna teknik utbredda artefakter vilket omöjliggjorde åtföljande adekvata morfologiska bedömningar inklusive immunhistokemi.

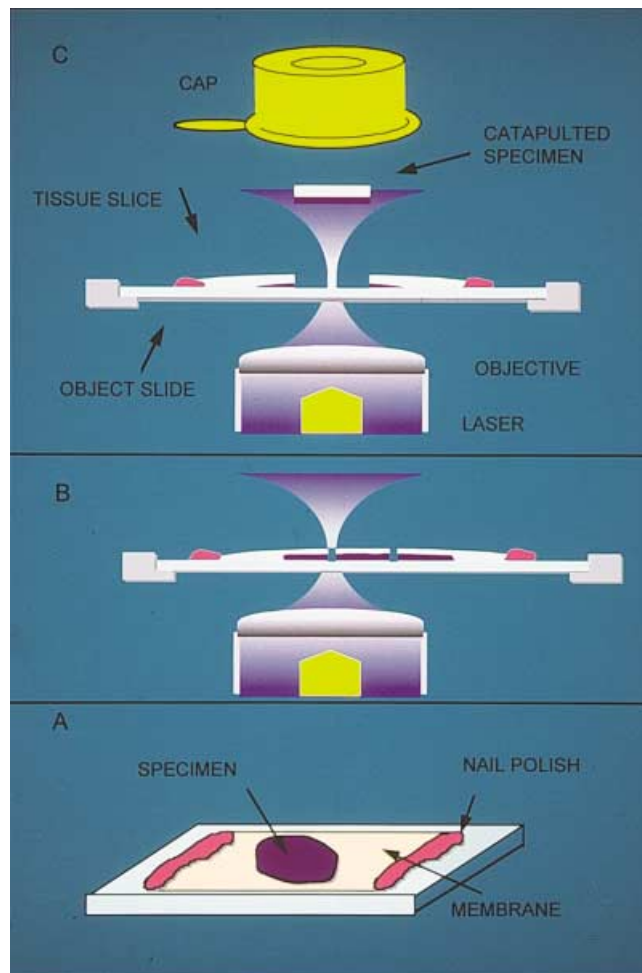
Under de senaste åren har det skett en närmast explosionsartad utveckling av laserbaserad mikrodisektion, vilket bland annat avspeglas i ett stort antal vetenskapliga artiklar och att det sedan 1998 anordnas återkommande konferenser fokuserade på mikrodisektion.

Flera instrument på marknaden

Olika firmor har attackerat problemet med mikrodisektion på olika sätt. Det system som vi känner bäst till och har erfarenhet av är PALM (Positioning and Ablation Laser Microbeamscope, se <http://www.palm-mikrolaser.com>). Ett annat system som utvecklats är LCM (Laser Capture Microdissection, se <http://dir.nichd.nih.gov/lcm/lcm.htm>).

LCM bygger på att en värmegenererande laser samman-smälter en polymerfilm med vävnad av intresse. Vävnadssnittet täcks av en transparent film som kan fås att sammansmälta med den underliggande vävnaden då filmen träffas av laserstrålen. Mikroskopiskt utvalda cellpopulationer eller celler från ett vävnadssnitt kan med hjälp av den finfokuserade laserstrålen specifikt överföras till polymerfilmen. Denna kan sedan transfereras till ett analysrör för vidare processning med exempelvis PCR. LCM har använts för att studera genförändringar i grupper av tumörceller [3-5], till exempel enstaka grupper prostata-adenokarcinom-körtlar [6], medan PALM-systemet även möjliggör undersökning av enskilda celler [7-9].

PALM-systemet arbetar med en kvävelaser, kopplad till ett mikroskop vanligen av typen Axiovert 135 (Figur 1). Ett objektiv fokuserar laserstrålen på objektet, vilket ger en »spot size« mindre än 1 µm. Denna koncentration av fotontäthet kan användas för att destruera enskilda celler eller vävnad utan att skada eller påverka angränsande celler [10, 11]. Genom att använda »laser cutting« kan man således isolera intakta cellgrupper eller enskilda celler på ett vävnadssnitt. Dessa kan sedan »plockas« upp och överföras till ett provrör för att använ-



Figur 2. Bilden visar schematiskt användande av lasermikrodisektion med »katapultning« (LPC) för uppsamling av isolerat material.

A. Vävnaden har monterats på ett 1,35 µm tunt polyetylenmembran som är fastsatt på ett objektglas med fixogum.

B. Mikrodisektion av materialet som lämnar ett glapp mellan valda och icke valda celler.

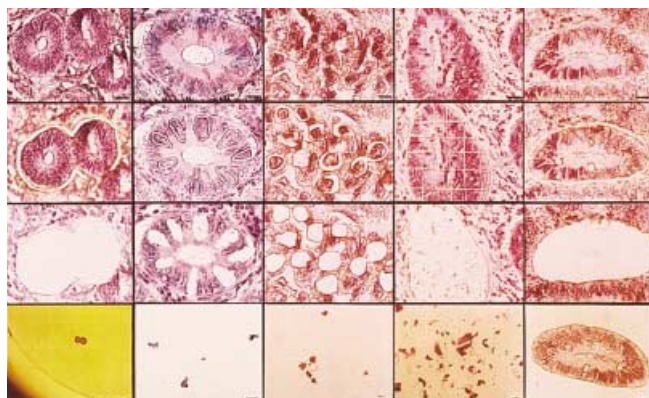
C. LPC av det utvalda, dissekerade materialet till locket av analysröret.

das vidare, till exempel som mall för PCR. Den fokuserade laserstrålen medger till och med att enskilda kromosomer eller delar av kromosomer kan isoleras och tas om hand för analys [12]. Förutom mikrodisektion kan PALM-systemet även användas för mikromanipulation.

Uppsamlade av vävnad

Beroende på vilka frågeställningar man har väljs utgångsmaterial och metod för analys. Ett vanligt vävnadssnitt, förslagsvis 12–16 µm tjockt, från färsk eller fixerad vävnad läggs på ett tunt objektglas. Detta kan sedan färgas med histo- eller immunhistokemiska metoder. Därefter isoleras de celler man vill undersöka med hjälp av »laser cutting«. Genom användandet av mikromanipulatorn går det att direkt samla upp det dissekerade materialet på spetsen av en nål eller kapillärpipett [13].

En nackdel är svårigheten att säkert föra över det upplockade materialet till provröret. Systemet har därför vidareutvecklats med ett så kallat »Laser Pressure Catapulting« (LPC)-system (Figur 2), vilket medger direkt uppsamling av mikrodisekerat material i ett provrör [14]. Denna »katapultning« uppnås genom att sänka fokuseringen av laserstrålen strax under vävnadssnittet och sedan »skjuta« upp isolerade



Figur 3. Denna bild illustrerar praktisk användning av mikrodisektion och LPC. Som utgångspunkt har arkivmaterial från ett kolonadenokarcinom använts. Översta raden visar vävnadssnitt (med cancerkörtlar) före mikrodisektion, andra raden visar samma vävnadssnitt efter mikrodisektion, tredje raden visar snittet efter »katapultning« med LPC och i nedersta raden ses locket av analysröret med det material som uppfångats med LPC. Från detta material kunde en punktmutation i kodon 12 av c-Ki-ras2 -mRNA påvisas efter nested RT-PCR-analys [16].

celler eller cellgrupper i locket av ett så kallat Eppendorfrör. Såväl DNA som RNA har visat sig bli välbevarat med denna metod. Figur 3 visar flera exempel på celler och vävnad som isolerats och sedan uppfångats via LPC för vidare analyser.

Analysmetoder

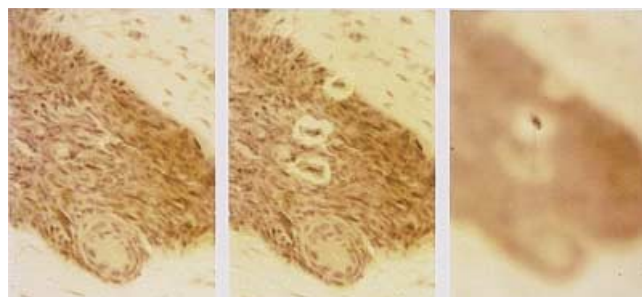
I många fall är det önskvärt att erhålla enstaka celler för PCR- eller RT-PCR-baserade analyser. Utgångskraven är olika beroende på vilken vävnad som skall undersökas (fixerad eller ofixerad). I fall där DNA skall analyseras från formalinfixerad vävnad måste formalinets degraderande effekt på DNA beaktas, varför minst ett 100-tal celler bör användas som startmaterial för att nå reproducerbara resultat [15]. Används å andra sidan fryst ofixerat material kan till och med enskilda celler framgångsrikt analyseras [13].

För att förstärka mängden utgångs-DNA kan olika metoder användas. DOP (Degenerate oligo priming)-PCR och PEP (Primer Extension Preamplification)-PCR används som ett första steg för universell amplifiering av vilket DNA som helst. Metoderna bygger på att man tillför en stor mängd olika, ospecifika och korta primers som kan binda överallt längs genom. Efter PCR fås en mängd olika fragment av DNA som representerar utgångscellens DNA. Efter detta steg kan sedan specifika primers användas för att amplifiera den gen man är intresserad av.

I fall där mRNA analyseras används omvänd transkription där degraderingskänsligt RNA omvandlas till mer stabilt cDNA [16]. Teoretiskt räcker det med mRNA från en enda cell, men i praktiken behövs betydligt flera då man vid fixering nästan alltid får brott på RNA-strängarna, och då färsk vävnad hanteras bryts RNA lätt ned av RNA-degraderande enzymer (RNAsaser). Av denna anledning måste RNA-strängar kopieras över till DNA-strängar innan de kan amplifieras. De isolerade och uppluckade cellerna analyseras, och därefter isolerar man mRNA med hjälp av olika tekniker, till exempel magnetkuler. Enzymet omvänt transkriptas används sedan för att tillverka komplementärt DNA (cDNA), vilket därefter kan amplifieras med olika tekniker. Nyligen publicerades en studie av transkriptionsprofiler som beskriver ett detaljerat protokoll för cDNA-syntes och RT-PCR på mikrodisekerat material [17].

Laserbaserad mikrodisektion inom tumörforskning

Laserbaserad mikrodisektion kan med fördel användas inom



Figur 4. Figuren visar hur en enskild tumörcell plockas upp med hjälp av laserassisterad mikrodisektion. Till höger ses p53-immunofärgat snitt av ett basaltumörcancerförband före mikrodisektion, i mitten ses tre enskilda tumörceller isolerade och till vänster ses den ena av dessa celler uppluckad på spetsen av en tunn glaskapillär [9].

tumörforskning för att analysera definierade cellpopulationer eller enstaka celler i ett vävnadssnitt. Tekniken medger även möjlighet att isolera och samla in celler från cytologiska preparat inkluderande cytocentrifugerade glas. Det är också möjligt att isolera enskilda kromosomer eller delar av kromosomer med denna teknik.

Vi har undersökt såväl kroniskt solbelyst hud [8] som enskilda tumörceller från basaltumörcancer [9] med avseende på förekomsten av mutationer. Den gen vi undersökt är p53 (den gen som oftast är muterad i human cancer). Vi utgick ifrån tunna skivor (16 µm) av färsk tumörvävnad som immunhistokemiskt färgats med en antikropp mot p53. Med hjälp av den mikromanipulator som är en del av PALM-instrumentet »plockade« vi sedan upp enskilda, isolerade tumörceller (Figur 4). Vi använde en PCR-teknik som bygger på amplifiering i två omgångar (nested) och med flera olika primers (multiplex) kombinerat med direkt sekvensering av genomiskt DNA. Vi fann att p53-mutationer var vanligt förekommande i normal hud [8]. I basaltumörcancer fann vi att såväl celler som färgats med p53-antikroppen som p53-negativa celler visade identiska mutationer. I enstaka celler fanns ytterligare p53-mutationer som tecken på tumörheterogenitet. Vidare gav denna teknik slutsatser som att basaltumörcancer utgår från en cell och att p53-mutationer sker tidigt under tumörutvecklingen [9].

Redan idag har tekniken använts för undersökningar av Hodgkins sjukdom. Genom att selektivt kunna analysera de i minoritet förekommande Reed-Sternberg-cellerna har man kunnat avgöra att dessa är monoklonala och av B-cellsursprung [18].

Flera andra områden inom lymfomforskningen lämpar sig också väl för mikrodisektion av enstaka celler eftersom tumörcellspopulationen kan vara blandad och omges av en stor mängd normalceller. Att undersöka de tumörceller som finns spridda i epidermis vid till exempel mycosis fungoides (en form av hudlymfom) eller förstadiet av malignt melanom (melanom in situ) kan endast göras om enskilda celler isoleras och analyseras [19]. I flera tumörer som är blandade, till exempel spottkörteltumörer, embryonal cancer eller bifasiska sarkom, skulle förfinad mikrodisektion kunna användas för att förstå de olika ingående komponenternas betydelse.

Tekniken är också etablerad vid Norwegian University of Science and Technology (NTNU) i Trondheim, där den används för att isolera och studera genuttryck (mRNA) i enstaka celler från mag-tarmkanalen.

Stor betydelse i framtiden

Helt klart kommer lasermikrodisektion att få betydelse inom ett mycket stort antal områden där analys av cellaktivitet i en

II Fakta 1

Områden där laserbaserad mikrodisektion har använts eller kan tänkas få stor betydelse

Diagnostik:

- Cancer, heterogena cellpopulationer, malignitetsgradering
- Terapieresistenta cellpopulationer i en tumör
- Preimplantationsdiagnostik
- Prenatal diagnostik
- Transplantatavstötning, autoimmuna sjukdomar
- Missbildningar

Forskning:

- Cancer, heterogenitet, klonalitet, stromainteraktioner, angiogenes
- Utvecklingsbiologi, cellinteraktioner under fosterutveckling
- Inflammatoriska tillstånd, transplantationsmedicin
- Farmakologiska och toxikologiska studier
- Rättsmedicinska applikationer

komplikerad vävnad är önskvärd (Fakta 1). Egentligen är det bara fantasin som sätter gränser för vad som kan undersökas med dessa nya tekniker. Det ovan nämnda exemplet med basallcellscancer fokuserar bara på en tumörtyp och en gen. Naturligtvis finns en uppsjö av olika gener som är av betydelse för olika tumörer. Enligt dagens förståelse av hur cancer uppstår krävs det att flera olika gener förändras, förstörs eller amplifieras. Sannolikt behövs också förändringar i de gener som har hand om DNA-reparation och genomets integritet för att en malign tumör ska uppstå. Lasermikrodisektion skulle kunna bidra till att besvara grundläggande frågor såsom i vilken ordning dessa genetiska förändringar sker, vilka celltyper som är känsliga för just vissa genförändringar och vad som skiljer olika förstadier till cancer från fullt utvecklad och spridd cancer.

Kanske finns det områden inom en tumör som avspeglar tumörens biologiska potential eller innehåller information som medger en mer specifik behandling eller har genetiska förändringar som motverkar immunförsvarets försök att bekämpa tumören. Andra områden inom tumörforskningen som kan dra nytta av denna teknik är analyser av hur tumörceller kommunicerar med och rekryterar det för tumören nödvändiga tumörstromat.

Förutom cancerforskning kan tekniken säkerligen utnyttjas för att bättre förstå mekanismer bakom missbildningssyndrom, utveckling av ateroskleros och sjukdomar orsakade av mikroorganismer, för att bara nämna några exempel.

Vi vill också peka på den nu närmast unika möjligheten som finns att kombinera morfologi med sofistikerade gen-, transkriptions- och proteinanalysmetoder. Vi menar att möjligheterna nu finns att skapa kraftfulla diagnostiska enheter där morfologiskt kunniga personer samarbetar nära med personer med molekylärbiologisk/immunologisk och genetisk kompetens.

Dessutom är det arkivmaterial som finns på patologi-laboratorier i form av paraffinklotsar en »guldgruva« att användas i analyser av denna typ såväl retrospektivt som prospektivt. Fixerat material kan användas för många analyser, dock finns det, som beskrivits ovan, en del problem när små mängder celler används som utgångspunkt. Av denna anledning är det viktigt att det också görs en systematisk frysning av färsk väv-

nad (biobanking) för framtida analyser. Dessa biobanker, i kombination med de välutvecklade och täckande register som vi har i Sverige, kommer att bli en ovärderlig källa för framtidens medicinska forskning.

Öppnar för ökad förståelse

Med nuvarande kraftfulla instrument inom molekylärbiologi, exempelvis DNA-mikroarraytekniker, kan nu i princip aktiviteten av människans samtliga gener analyseras. Sådana metoder i kombination med mikrodisektion kommer med all säkerhet att bidra till en ökad förståelse för hur olika vävnader och cellpopulationer är aktiverade och/eller förändrade vid sjukdomsuppkomst.

Vidare kommer genetiska och fenotypiska skillnader att kunna avgöras, liksom hur celler påverkar varandra på olika sätt, exempelvis »auto och parakrino«. Som följd kommer detta att leda till att sjukdomar kan såväl diagnostiseras/prognoseras som behandlas bättre. Vi står bara i spelöppningen av detta fascinerande fält.

Referenser

1. Isenberg G, Bielser W, Meier-Ruge W, Remy E. Cell surgery by laser micro-dissection: a preparative method. *J Microsc* 1976; 107(1):19-24.
2. Meier-Ruge W, Bielser W, Remy E, Hillenkamp F, Nitsche R, Unsold R. The laser in the Lowry technique for microdissection of freeze-dried tissue slices. *Histochem J* 1976;8(4):387-401.
3. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996;274(5289):998-1001.
4. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis [review]. *Trends Genet* 1998;14(7):272-6.
5. Gillespie JW, Ahram M, Best CJ, Swallow JI, Krizman DB, Petricoin EF, et al. The role of tissue microdissection in cancer research [review]. *Cancer J* 2001;7(1):32-9.
6. Rubin MA. Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays, and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer [review]. *J Pathol* 2001;195(1):80-6.
7. Schütze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol* 1998;16(8):737-42.
8. Ling G, Persson A, Berne B, Uhlen M, Lundeberg J, Ponten F. Persistent p53 mutations in single cells from normal human skin. *Am J Pathol* 2001;159(4):1247-53.
9. Ponten F, Williams C, Ling G, Ahmadian A, Nister M, Lundeberg J, et al. Genomic analysis of single cells from human basal cell cancer using laser-assisted capture microscopy. *Mutat Res* 1997;382(1-2):45-55.
10. Schütze K, Clement-Sengewald A. Catch and move-cut or fuse [review]. *Nature* 1994;368(6472):667-9.
11. Schütze K, Pösl H, Lahr G. Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine. *Cell Mol Biol* 1998;44(5):735-46.
12. Schermelleh L, Thalhammer S, Heckl W, Pösl H, Cremer T, Schütze K, et al. Laser microdissection and laser pressure catapulting for the generation of chromosome-specific paint probes. *Biotechniques* 1999;27:362-7.
13. Persson AE, Ling G, Williams C, Backvall H, Ponten J, Ponten F, et al. Analysis of p53 mutations in single cells obtained from histological tissue sections. *Anal Biochem* 2000;287(1):25-31.
14. Schütze K, Lahr G, Burgemeister R. The force of focused light in different areas of cell and molecular biology. *J Mol Med* 2000;78(7):B21.
15. Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999;155(5):1467-71.
16. Lahr G. RT-PCR from archival single cells is a suitable method to analyze specific gene expression. *Lab Invest* 2000;80(9):1477-9.
17. Scheidl SJ, Nilsson S, Kalen M, Hellstrom M, Takemoto M, Hakansson J, et al. mRNA expression profiling of laser microbeam microdissected cells from slender embryonic structures. *Am J Pathol* 2002;160(3):801-13

18. Braeuninger A, Kuppers R, Strickler JG, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(17):9337-42.
19. Cerroni L, Minkus G, Putz B, Hofler H, Kerl H. Laser beam microdissection in the diagnosis of cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 1997;136(5):743-6.

SUMMARY

Sharper diagnostic tool the future promise of laser-assisted microdissection

Fredrik Ponten, Karin Tømmerås, Erik Larsson

Läkartidningen 2002;99:3414-8

The paper describes the use of laser-assisted microdissection to retrieve microscopically defined cell populations including single cells from tissue sections for subsequent analysis of genomic DNA and mRNA. A general background is given on the techniques available and requirements for PCR based on minute templates. Different pre-PCR approaches are briefly described and possibilities and limitations of using archival material compared to fresh frozen tissue are discussed.

In the article we give one example on how we have used the PALM laser microscopy system in combination with a nested, multiplex PCR system to analyze single normal keratinocytes as well as tumor cells from a case of basal cell cancer. We found that p53 mutations are common in normal, chronically sun-exposed skin. Widespread yet common mutations in the p53 gene that were unrelated to immunoreactivity for the p53 antibody were found in tumor cells. In addition there were rare mutations in occasional tumor cells that apparently did not result in selective growth advantage.

Perspectives for the future are presented and the potential of laser assisted microdissection is highlighted within the fields of cancer research, developmental studies as well as studies of inflammatory and degenerative diseases. The combination of a method that allows careful selection of defined cells with powerful micro array based techniques, provides a setting with potential to uncover pathogenic mechanisms for large variety of human diseases.

Correspondence: Erik Larsson, Dept of genetics and pathology, Akademiska sjukhuset, SE-751 85, Uppsala, Sweden

Särtryck Läkartidningen

I samband med 1994 års handikappreform beslutade riksdagen att stimulera utvecklingen av rehabilitering och habilitering med 1,4 miljoner kronor, bidrag som Socialstyrelsen fördelade och följde upp. Ett axplock av de medicinskt fokuserade projekt som bedömts vara av riksintresse har presenterats som separata artiklar i Läkartidningen under 1996 och 1997 och i serieform under 1999–2001.

Denna serie har nu samlats i ett särtryck, som av Socialstyrelsens projektgrupp kompletterats med två rapporter som inte redovisats i tidningen.

Särtrycket täcker ett brett spektrum av rehabilitering och habilitering, t ex vid slaganfall, demens och svåra hjärnskador, för barn med särskilda behov och de många små grupperna med ovanliga funktionshinder. Skriften har distribuerats av Socialstyrelsen. En mindre upplaga finns att beställa från Läkartidningen.

Priset är 85 kronor



Habilitering och rehabilitering

Beställer härmed.....ex av
Habilitering och rehabilitering

.....
namn

.....
adress

.....
postnummer

.....
postadress

**Insändes till Läkartidningen
Box 5603
114 86 Stockholm**

Faxnummer: 08-20 74 35

**www.lakartidningen.se
under särtryck, böcker**