

Prof. dr hab. Jan Kuryszko, prof. zwycz..
Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt
Zakład Histologii i Embriologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marii Koziół pt: "Optymalizacja sporządzenie preparatów histologicznych w chirurgii mikrograficznej Mohsa"

Chirurgia mikrograficzna Mohsa (MMS) jest metodą terapii nowotworów skóry, polegającą na chirurgicznym, etapowym usunięciu tkanek patologicznych z następną oceną histologiczną marginesów wycięcia. Postępowanie chirurgiczne jest uzależnione od wyników badania mikroskopowego.

Prekursorem tej metody był amerykański chirurg Frederic E. Mohs, który w latach trzydziestych XX wieku po raz pierwszy zastosował chemiczne niszczenie i zarazem utrwalenie tkanek nowotworu, przy użyciu 20% chlorku cynku. Podczas prowadzonych badań po zaaplikowaniu pod skórą roztworu struktura została całkowicie zachowana, podobnie jak w przypadku tkanek utrwalonych w formalinie. To spostrzeżenie przyczyniło się do opracowania metody, mającej na celu niszczenie i utrwalanie i chemiczne utrwalanie w formalinie. Obserwacje te przyczyniły się do opracowania metody, mającej na celu niszczenie i utrwalanie *in vivo* z następną i szybką oceną histologiczną marginesów wycięcia. Moh F. E (1944) opatentował własną technikę mającej na celu niszczenie chemiczne i utrwalanie tkanek *in vivo* z następną i szybką oceną pasty z chlorkiem cynku. Metoda ta polega na: usunięciu większej masy guza nowotworu poprzez nacięcie lub łyżeczkowanie i naniesienie na podłoże rany pasty z chlorkiem cynku, powodującej jej stwardnienie, a następnie po 1- 3 dni warstwowe wycięcie tkanek podłoża wraz z następną oceną mikroskopową skrawków obrazujących cały i głęboki margines chirurgiczny. Metoda ta uzyskała termin „chemochirurgii”

Jedną z jej podstawowych, nowatorskich cech było wprowadzenie ścisłej orientacji kierunkowej- mapowanie guza, umożliwiającego dokładne zlokalizowanie w powłokach ciała pacjenta nieusuniętych nacieków nowotworu, widoczny w preparatach histologicznych. Metoda cechowała się bardzo wysokimi wskaźnikami wyleczalności, korzystniejszymi niż we wszystkich pozostałych sposobach leczenia.

Wprowadzone techniki chirurgii mikrograficznej w Europie przyczyniło się do rozwoju wielu lokalnych modyfikacji, będących wyrazem dostosowania się do specyficznej organizacji zdrowotnej. Powstało wiele odmian chirurgii mikrograficznej Mohsa, różniących się sposobem wycięcia tkanek jak i przygotowaniem ich przed etapem badania histologicznego. Najważniejsze z nich to metoda trójwymiarowej histologii Breuningera oraz metoda „monachijska” Burga i Konza.

Istotną metodą uwidocznienia tkanek nowotworowych w chirurgii mikrograficznej Mohsa są metody immunohistochemiczne. Techniki te wykorzystuje się w przypadkach, w których trudno ustalić rozpoznanie na podstawie klasycznej mikroskopowej oceny morfologicznej. Badanie polegające na wykorzystaniu i lokalizacji antygenów tkankowych za pomocą swoistych przeciwciał (głównie klasy IgG), które najczęściej wiążą się z antygenami występujących specyficznie w komórkach danego nowotworu.

W dermatologii często wykorzystywane są przeciwciała monoklonalne, ze względu na ich wysoką swoistość – wykrywanie jednej i ściśle określonej determinanty antygenowej.

Doktorantka, jako cel swoich badań postawiła opracowanie własnego schematu barwienia preparatów histologicznych, który zapewniłby jak najwyższą jakość przy najkrótszym czasie preparatyki. Zamierzała porównać preparaty histologiczne wykonywane techniką parafinową oraz techniką skrawków mrożonych o różnych schematach barwienia. Ponadto nastąpi porównanie preparatów histologicznych wykonanych techniką skrawków mrożeniowych i barwionych H i E z zastosowaniem różnych metod: rutynowej długiej (trwającej 15 min 35 sek), własnej (trwającej 4 min 54 sek), oraz bardzo krótkiej wg Petersa (trwającej ok. 2 min).

Praca doktorska mgr inż. Marii Koziół przedstawiona w formie druku opracowanego w systemie komputerowym obejmuje 91 stron tekstu, 114 pozycji bibliograficznych, 27 fotografii i mikrofotografii, 9 tabel i 15 wykresów.

W 28 stronicowym „Wprowadzeniu i wstępie” Autorka z bardzo dobrą znajomością zagadnienia przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący chirurgii mikrograficznej Mohsa ze wszystkimi aspektami zagadnień mikromorfologicznych.

Opracowanie własnego materiału skrawków mrożeniowych na cele Pracowni Chirurgii Mohsa jest prowadzone w Klinice Dermatologii od kilku lat. Do badań porównujących preparaty histologiczne, wykonane techniką parafinową, techniką skrawków mrożeniowych oraz metodą własną. Pobrano wycinki tkankowe z raków podstawnocomórkowych pochodzących od 70 pacjentów. Każdy z nich podzielono na dwie części, z której jedną

opracowano w technice skrawków parafinowych, drugą- skrawków mrożeniowych. Do badań porównanych preparaty histologiczne, wykonane techniką skrawków mrożonych o różnych schematach barwienia: metodą własną oraz bardzo szybką metodą wg Petersa, pobrano wycinki tkankowe pochodzące od 104 pacjentów. Każdy z pobranych wycinków tkankowych podzielono na 2 części, z których sporządzono preparaty mrożone, barwione na 2 opisane sposoby.

Jakość preparatów histologicznych oceniona była podczas badania w mikroskopie optycznym przez dwóch lekarzy: chirurga (operującego techniką Mohsa) i histopatologa. Ocenie poddano preparaty z tkanek nabłonkowych, w których wyszczególniono następujące elementy:

1. integralność preparatu, 2. zabarwienie preparatu, 3 strukturę tkanek nabłonkowych (pow. 20x, 40x, 100x).

Wykonano analizę statystyczną, gdzie wszystkie dane zostały usystematyzowane pozwalające na wykonanie pewnej analizy statystycznej. Przy zastosowaniu tablic wielodzielniczych wyznaczono częstość występowania poszczególnych ocen. Występowanie istotnych statystycznie różnic sprawdzono, stosując test chi kwadrat Pearsona i chi kwadrat największej wiarygodności. Następnie zastosowano nieparametryczną analizę wariancji test Anova Rang Kruskala- Wallisa z testem post hoc w przypadku trzech zmiennych, bądź test Manna-Whitneya. W przypadku dwóch zmiennych. Dla całego badania statystycznego przyjęto jako wartość graniczną dla odrzucenia hipotezy zerowej $p=0,05$.

W przeprowadzanych badaniach własnych Doktorantka zastosowała skracanie poszczególnych etapów barwienia mrożeniowych skrawków tkankowych, w wyniku, czego opracowała własny szybki szereg barwienia trwającego 4 min 54 sek, podczas gdy rutynowa metoda zajmuje 15 min 35 sek. Jego zastosowanie pozwala na uzyskanie dobrych jakościowo preparatów przy krótkim czasie obróbki, co w swej istocie spełnia wymogi techniki chirurgii mikrograficznej Mohsa. Wykazano również, że jakość preparatów barwionych własną metodą jest wyższa niż barwionych metodą Petersa. Badania te pozwolą na zalecenie własnej metody barwienia, jako optymalnej do zastosowania w diagnostyce marginesów wycięć raków skóry. Jakość preparatów, w których tkankę mrożono w ciekłym azocie jest wyższa od preparatów, w których tkankę mrożono w kriostacie z wykorzystywaniem ewakuatora ciepła.

W ocenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Marii Kozioł należy podkreślić dużą aktualność podejmowanego problemu. Uważam, że takie badania powinny być rozwijane zarówno w aspektach histofizjologicznych jak i klinicznych.

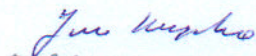
Praca została dobrze zaplanowana i konsekwentnie zrealizowana, co istotnie dowodzi o bardzo dobrym przygotowaniu i zaangażowaniu Autorki w realizację tematu. Recenzowana praca została napisana jasno i zrozumiale. Uwagę recenzenta zwraca bardzo dobra dokumentacja i odpowiednio dobrana i wyselekcjonowana bibliografia.

Proponuję, więc wyróżnienie tej pracy stosowną nagrodą.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Marii Koziół pt.: "Optymalizacja sporządzania preparatów histologicznych w chirurgii mikrograficznej Mohsa" w pełni odpowiada wymogom Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych oraz o Stopniach i Tytułach w zakresie Sztuki stawianym Kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora.

Przeto więc przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie w/w pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 16 marca 2016 r.


prof. dr hab. Jan Kuryszko
prof. zw.