

Prof. dr hab. n. med. Stanisław Orkisz  
Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka  
Katedra Nauk Morfologicznych  
Wydziału Medycznego UR

Łódź, 12.08.2015

Dziekanat  
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego  
wpłynęło dn. ....2015.-09-11....  
podpis *K. Kumbak* i.dz. ....1908.....

## OCENA

### Rozprawy doktorskiej lek. Anny Chruściel

#### pt: „Badania ultrastrukturalne wycinków skóry w wybranych chorobach dermatologicznych”

Skóra człowieka jest nie tylko największym, ale i skomplikowanym ze względu na liczne ważne życiowo funkcje, narządem człowieka. Wzrost zainteresowania schorzeniami skóry jest konsekwencją rozwoju społeczeństw, niosącego szereg problemów związanych z zanieczyszczeniem środowiska substancjami toksycznymi, stresem, nieprawidłowym odżywianiem, warunkami bytowania sprzyjającymi alergizacji, wpływem promieniowania ultrafioletowego czy też czynników genetycznych. Szczególnie istotną funkcję ochronną pełni w tym względzie jej najbardziej zewnętrzna warstwa; nabłonek wielowarstwowy płaski czyli naskórek. Kluczowe znaczenie dla jego odnowy ma warstwa rozrodcza którą tworzą keratynocyty warstwy podstawnej i kolczystej. Obecne w nim komórki macierzyste charakteryzują się zdolnością samoodnowy i zapewniają wysoki potencjał proliferacyjny naskórka. Pomimo wieloletnich badań nad mechanizmami powstawania schorzeń o podłożu hyperproliferacyjnym, wciąż trwają poszukiwania metod i technik ułatwiających diagnostykę i różnicowanie tych schorzeń.

Praca lek. Anny Chruściel, która przystępując do badań założyła że dokona porównania zmian zachodzących w ultrastrukturze naskórka oraz oceni aktywność transkrypcyjną jego komórek u pacjentów z rakiem podstawnokomórkowym oraz u pacjentów z nienowotworowymi chorobami o podłożu hyperproliferacyjnym; łuszczycą i kontaktowym zapaleniem skóry, wpisuje się w ten nurt wieloletnich poszukiwań. Wyniki swoich badań Doktorantka przedstawiła w rozprawie: ”Badania ultrastrukturalne wycinków skóry w , wybranych chorobach dermatologicznych”. Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora ma formę wydruku komputerowego o objętości 143 stron, w którym tekst pracy zilustrowany jest 7 tabelami, 6 wykresami oraz 39-oma mikrofotografiami i ich opisami. Osiem mikrofotografii ilustruje preparaty półcienkie wycinków skóry pobranych od chorych z łuszczycą, kontaktowym zapaleniem skóry i rakiem podstawnokomórkowym. Sześć przedstawia obrazy po wysrebrzeniu metodą AgNOR a pozostałe 25 fotografii stanowi elektronogramy komórek naskórka pobranego w przebiegu badanych chorób. Układ pracy jest typowy ze wstępem, celem pracy, danymi o materiale i metodyce badań, dyskusją i wnioskami. Spis piśmiennictwa liczy 267 pozycji, z których 4 pochodzą z ostatnich 5. lat a 54 obejmuje okres ostatnich 10 lat.

W rozbudowanym 29-stronicowym wstępie Autorka bardzo szeroko omawia budowę skóry właściwej, szczególną uwagę zwracając się na warstwę podstawną naskórka, wyróżniając w niej komórki macierzyste i podkreślając możliwość różnicowania tych komórek w procesie odnowy naskórka. W dalszych rozważaniach dotyczących tych komórek Doktorantka skoncentrowała się na białkach markerowych swoistych dla komórek macierzystych omawiając szeroko ich rolę w regulacji procesu proliferacji, zaangażowanie w apoptozę oraz podziały komórkowe zarówno komórek macierzystych jak i keratynocytów. Przechodząc do omówienia regulacji proliferacji keratynocytów, w oparciu o rozległą literaturę, bardzo szczegółowo przedstawiła rolę i współdziałanie licznych czynników wzrostu, czynników zapalnych, interleukin, czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w regulację procesu wzrostu i różnicowania keratynocytów. Omawiając kontrolę powyższych procesów, Autorka skupiła się na genach supresorowych /antyonkogenach/, kodujących białka regulatorowe wpływające na cykl komórkowy i transkrypcję jądrowego DNA.

We wstępie zwraca uwagę nie tylko znajomość problematyki z bardzo dobrym cytowaniem piśmiennictwa, ale także jasny sposób przedstawiania złożonych problemów procesów różnicowania i proliferacji oraz leżących na pograniczu nauk podstawowych i klinicznych. Obszerne piśmiennictwo jest krytycznie dobrane, w celu wskazania trudności w interpretowaniu eksperymentów przeprowadzanych w różnych warunkach i na różnych modelach doświadczalnych. Ponadto Doktorantka podkreśla, iż mimo licznych badań molekularnych mechanizmów proliferacji i śmierci komórki, nasza wiedza odnosząca się do zaburzonej równowagi między tymi procesami, pozostaje niepełna.

Z tego wprowadzenia wyłonił się jasno cel rozprawy Autorki, która postanowiła w badaniach submikroskopowych wycinków skóry pacjentów z łuszczycą, kontaktowym zapaleniem skóry oraz rakiem podstawnokomórkowym prześledzić ultrastrukturę keratynocytów oraz ocenić ich aktywność transkrypcyjną po uwidocznieniu interfazalnych regionów organizatora jąderkowego.

Aby powyższe cele zrealizować, wykonała następujące badania:

- po pierwsze, w badaniach skrawków półcienkich na poziomie mikroskopu świetlnego, oceniała morfologię naskórka uzyskanego ze zmian chorobowych pacjentów z łuszczycą, przewlekłym kontaktowym zapaleniem skóry oraz rakiem podstawnokomórkowym
- po drugie, bardziej szczegółowe obserwacje komórek naskórka u tych samych pacjentów poczyniła na poziomie mikroskopu elektronowego
- po trzecie, w badaniach cytochemicznych stosując technikę AgNOR w jądrach keratynocytów pacjentów z kontaktowym zapaleniem skóry, łuszczycą i rakiem podstawnokomórkowym uwidoczniała lokalizację białek argyrofilnych
- po czwarte, dokonała analizy morfometrycznej plam AgNOR, oceniając średnią powierzchnię pojedynczej plamy, średnią liczbę plam w jądrze, średnią powierzchnię profilu AgNOR oraz współczynnik zawartości AgNOR.

Na podkreślenie zasługuje komplementarność doboru zastosowanych technik badawczych. Techniki te Autorka opisała bardzo dokładnie, nie unikając niekiedy żargonu, np. używając wielokrotnie zwrotu „skupiska komórek bazaloidalnych”, w odniesieniu do komórek przypominających keratynocyty warstwy podstawnej naskórka. Jednakże, dla morfologów tak szczegółowe opisy metod mają aspekt praktyczny; umożliwiają bowiem nie tylko zapoznanie się ze stosowanymi technikami, ale pozwalają także prześledzić sposób rozumowania w wybranej procedurze. Pozwalają także zauważyć błędy których Autorka nie uniknęła. Na stronie 34 opisując etapy procesu srebrzenia, pisze o utrwalaniu rogówek w 1,6% roztworze aldehydu glutarowego. W następnym zdaniu uzupełnia procedurę dotrwalaniem tkanki w płynie Cannoy, mając zapewne na myśli płyn Carnoya. Nie jest ponadto jasne jakie kryteria przyjęła Autorka wybierając spośród 40 pacjentów zakwalifikowanych do badania histopatologicznego, 22 osoby do badań ultrastrukturalnych i cytochemicznych.

Realizując ambitne zadanie badawcze, Doktorantka dokonała analizy obrazu ultrastrukturalnego zmian chorobowych pacjentów z łuszczycą, przewlekłym kontaktowym zapaleniem skóry oraz rakiem podstawnokomórkowym. Przedstawiając ultrastrukturę naskórka łuszczycowego, zwraca uwagę na szereg cech charakterystycznych dla tej jednostki chorobowej, nie spotykanych w skórze zdrowej. Niestety nie ilustruje tych różnic obrazami skóry zdrowej, co każe przypuszczać że zmiany te odnosi do literaturowego opisu naskórka prawidłowego. Pewną niekonsekwencję można znaleźć w opisie błony podstawnej. Na stronie 37 Doktorantka ocenia ją jako „ciągłą, wielowarstwową bez wyraźnych ubytków”, podczas gdy w dyskusji na stronie 94 przedstawia ją jako „ciągłą z pojedynczymi ubytkami w jej przebiegu”. W opisach jąder i jąderek, Autorka podkreśla różnice w wielkości tych struktur. Być może tak jest, jednakże wątpliwości odnośnie tej konstatacji mogła uniknąć obiektywizując to spostrzeżenie badaniami morfometrycznymi, zwłaszcza że przedstawia elektronogramy keratynocytów w różnych powiększeniach. Ta uwaga dotyczy także oceny wielkości jąder keratynocytów w kontaktowym zapaleniu skóry, zdaniem Autorki mniejszych, co ilustrują zdjęcia 12 i 14.

Na tym tle bardziej przekonujące są obrazy obszarów srebrochlonych w technice AgNOR, we wszystkich badanych schorzeniach. Ich pomiary pozwalają ocenić aktywność transkrypcyjną jąder keratynocytów w badanych schorzeniach u podłoża których leży proces hyperprolifracji. Jądra raka podstawnokomórkowego uwiadcniają dobrze odgraniczone mniej liczne ale większe niż w nabłonku łuszczycowym, plamy argyrofilne. Odmienny obraz argyrofili Doktorantka zaobserwowała w kontaktowym zapaleniu skóry. Swoje spostrzeżenia zweryfikowała analizą statystyczną obejmującą pomiary średniej powierzchni pojedynczej plamy, średnią liczbę plam w jądrze, średnią powierzchnię profilu AgNOR w jądrze oraz współczynnika zawartości AgNOR. Najwięcej znamienych statystycznie różnic w obrębie badanych parametrów wykazała pomiędzy kontaktowym zapaleniem skóry i łuszczycą. W zestawie badanych parametrów raka podstawnokomórkowego z łuszczycą różnicowała znamieną statystycznie liczbę plam AgNOR w jądrze. W raku podstawnokomórkowym wykazała również najwyższą wartość współczynnika zawartości AgNOR.

W dyskusji Autorka wykazała się dobrą znajomością problemów związanych z tematyką pracy, rzeczowością, umiejętnością interpretacji swoich wyników w świetle obszernego piśmiennictwa. Z obowiązku recenzenta pragnę zauważyć że oceniając obraz

ultrastrukturalny kontaktowego zapalenia skóry nie dokonała rozróżnienia w zależności od czynnika je wywołującego, co może rzutować na obraz ultrastrukturalny. Zresztą, sama Doktorantka zauważa to w dyskusji na stronie 96. Uważam ponadto że w dyskusji można pominąć fragmenty dotyczące innych nowotworów które nie były przedmiotem badań/rak kolczystokomórkowy – str. 101/. Doktorantka w dyskusji odnosi się do możliwości praktycznego wykorzystania ilościowej analizy AgNOR w diagnostyce zmian skórnych, w tym różnicowania raka podstawnokomórkowego o agresywnym dającym przerzuty i wznowy /BCC2/ i nieagresywnym /BCC1/ przebiegu, czego nie dokonała w swojej pracy.

Sformułowane wnioski zamykające rozprawę, wynikają z przeprowadzonych badań w kontekście dotychczasowej wiedzy w badanym przedmiocie. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka sformułowała 6 wniosków, z których za najistotniejsze uważam:

- wniosek trzeci przedstawiający strukturę jąderk charakterystyczną dla komórek aktywnych transkrypcyjnie
- wniosek piąty oceniający aktywność transkrypcyjną jąder keratynocytów w badanych schorzeniach na podstawie analizy morfometrycznej znakowania srebrem AgNOR

Pozytywnie oceniam dokonany przez Doktorantkę wybór, zarówno aktualnej problematyki badawczej, istotnej dla praktyki klinicznej, jak również układu badawczego, konsekwentnie realizowanego i udokumentowanego. Pozostając przy pozytywnej ocenie wartości naukowej i praktycznej pracy pozwolę sobie zgłosić 3 uwagi polemiczne:

- W opisach ultrastrukturalnych jądra, Doktorantka podkreśla obecność dużych, aktywnych jąderk. Znany jest fakt że rutynowe kontrastowanie skrawków cienkich cytrynianem ołowiu i octanem uranylu w dużym stopniu maskuje strukturę przestrzeni interchromatynowej. Dlatego trudno jest zinterpretować zachowanie się morfologicznych wykładników transkrypcji prerybosomalnego RNA czy premRNA. W tej sytuacji dyskusyjne są też opisy niektórych rycin, np. ryc. 3 wskazujące na 3-5 jąderk z których niektóre wydają się być skupieniami heterochromatyny. W razie kontynuacji badań zachęcam do wykonania barwienia regresywnego z EDTA wg Bernharda, pozwalającego na różnicowanie struktur DNP i RNP jądra. Pozwoliłoby ocenić nie tylko proporcje składników jąderka, ale także zachowanie innych morfologicznych wykładników syntezy RNA. Przesłanek do takiej sugestii dostarczają liczne obrazy dużych skupień ziarnistości perichromatynowych.
- Uważam za zbyt śmiało twierdzenie że „poszerzone przestrzenie międzykomórkowe wypełnione są mucyną”/ np. w opisie ryc. 24, 25 i niektórych elektronogramów/. Na podstawie obrazu ME można tylko określić gęstość elektronową substancji wypełniającej te przestrzenie.
- W opisie keratynocytów łuszczycy na stronie 37, Doktorantka podaje obecność dużych ciałek jądrowych, które ilustrują ryc. 5-7. Tymczasem na elektronogramach w jądrach nie można ich znaleźć, podobnie jak na pozostałych obrazach jąder keratynocytów. Nasuwa się także przypuszczenie że elektronogramy keratynocytów łuszczycy odnoszą się jedynie do dwóch pól widzenia. Bowiem zdjęcia 5,6,7

przedstawiają jądro tej samej komórki w różnych powiększeniach, podobnie jak zdjęcie 8 i 9.

Drobne potknięcia językowe i formalne, jakie zauważyłem w pracy, nieistotne dla oceny jej wartości, przedstawiam w załączniku do niniejszej recenzji.

Na koniec chciałbym podkreślić wartość ocenianej rozprawy z punktu widzenia jej znaczenia dla oceny zmian keratynocytów w wybranych schorzeniach z wyraźną hyperproliferacją naskórka. Mimo dużej liczby badań ich różnicowanie morfologiczne nastęrcza nadal wielu problemów.

*Podsumowując, stwierdzam że praca lek. Anny Chruściel pt. "Badania ultrastrukturalne wycinków skóry w wybranych chorobach dermatologicznych", świadczy o dużej samodzielności Autorki w formułowaniu i rozwiązywaniu problemów badawczych. Praca wnosi istotne elementy poznawcze i praktyczne, wzbogaca naszą wiedzę dotyczącą chorób skóry o podłożu hyperproliferycyjnym, została wykonana zgodnie z zasadami prowadzenia prac naukowych i spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora.*

*Przedkładam przeto Wysokiej Radzie Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lek. Anny Chruściel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

*Andrzej Stawicki*

**Załącznik do oceny rozprawy doktorskiej lek. Anny Chruściel pt. „Badania ultrastrukturalne wycinków skóry w wybranych chorobach dermatologicznych”.**

- str. 2 – 12 linijka od dołu, jest: Metodyhistologiczne, winno być: Metody histologiczne
- str. 4 – 11 linijka od góry, jest: dermatynu, winno być: dermatanu
- str. 4 – 13 linijka od góry, jest: właściwa, winno być: właściwą
- str. 5 – 5 linijka od dołu, jest: następnie, winno być: następnie
- str. 8 – 6 linijka od góry, jest: namnażające, winno być: namnażających
- str.12 – 10 linijka od dołu, jest: równowaga, winno być: równowagę
- str. 14 – 12 linijka od dołu, jest: synteżowany, winno być: syntetyzowany
- str. 21 – 2 linijka od góry, jest: skory, winno być: skóry
- str. 25 – 11 linijka od dołu, jest: gnu p53, winno być: genu p53
- str. 27 – 2 linijka od góry, jest: nabłoniców, winno być: nabłonków
- str. 29 – 13 linijka od dołu, jest: lokalzacja, winno być: lokalizacja
- str. 33 – 2 linijka od góry, zbędnoe słowo oraz
- str. 34 – 2 linijka od dołu, jest: Cannoy, winno być: Carnoy
- str. 35 – 7 linijka od góry, jest: półcienie, winno być: półcienkie
- str. 36 – 5 linijka od góry, jest: obszry, winno być: obszary
- str. 37 – 5 linijka od dołu, jest: rybocomów, winno być: rybosomów
- str. 45 – 3 linijka od góry, jest: Niewielk, winno być: Niewielka
- str. 46 – 1 linijka od dołu, jest: keratochialiny, winno być: keratohialiny
- str. 46 – w opisie zdjęcia jest: Pm, na zdjęciu: p
- str. 62 – 12 linijka od góry, jest: połączenie, winno być: połączenia
- str.69 – 3 linijka od góry, jest: podstawna, winno być: podstawną
- str. 75 – 1 linijka od dołu, jest: pierzchnię, winno być: powierzchnię
- str. 79 - 2 linijka od dołu: podstawnokomórowy, winno być: podstawnokoórkowym
- str. 89 – 11 linijka od góry, jest: wystepowanie, winno być: występowanie
- str.90 – 11 linijka od góry: jak wyżej
- str. 91 – 2 linijka od dołu, jest: keratochialiny, winno być: keratohialiny
- str. 92 – 12 linijka od dołu, jest: jader, winno być: jąder
- str.94 – 13 linijka od góry, jest: keratochialina, winno być: keratohialina
- str. 95 – 5 linijka od góry, jest: filamentty, winno być: filamenty
- str. 96 – 14 linijka od góry, jest:ultrastrukturalny, winno być: ultrastrukturalny
- str. 97 – 12 linijka od dołu, jest: stosowany, winno być: stosowanym
- str. 98 – 9 linijka od dołu, jest: ponad to, winno być: ponadto
- str. 100 – 1 linijka od dołu, jest: rakim, winno być: rakiem
- str. 101 – 16 linijka od dołu, jest: retionidami, winno być: retinoidami
- str. 104 – 1 linijka od góry, jest: rak, winno być: raka
- str. 104 – 11 linijka od dołu, jest: charakterystyczny, winno być: charakterystycznych