

# Specyfika techniki histologicznej skrawków mrożonych w chirurgii mikrograficznej Mohsa

## The specificity of histological techniques of frozen sections in Mohs Micrographic Surgery

Maria Kozioł, Andrzej Bieniek

*Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu*

### STRESZCZENIE

Chirurgia mikrograficzna Mohsa (MMS, *Mohs micrographic surgery*) to metoda etapowego wycięcia chirurgicznego nowotworów skóry oparta na pełnej histologicznej analizie marginesów, prowadzona najczęściej w trybie śródoperacyjnym. Szybkie sporządzenie preparatów histologicznych obrazujących całość marginesów wycięcia (brzegów bocznych i dna) wymaga specjalnego postępowania, poczynając od rodzaju wycięcia chirurgicznego, poprzez markowanie topograficzne preparatów, ich podział, a także wszystkie etapy obróbki histologicznej. Autorzy, od kilkunastu lat pracujący metodą Mohsa w technice „świeżej tkanki” (skrawków mrożonych), przedstawiają liczne stosowane rozwiązania w tym zakresie. Omawiają szczegółowo budowę i działanie opatentowanego (i używanego przez siebie) urządzenia laboratoryjnego, pozwalającego na proste i precyzyjne wykonanie dużych preparatów histologicznych w MMS.

**Forum Derm. 2015; 1: 1, 6–11**

**Słowa kluczowe:** chirurgia mikrograficzna Mohsa, technika skrawków mrożonych, technika świeżej tkanki, preparatyka histologiczna, technika histologiczna

### ABSTRACT

Mohs Micrographic Surgery (MMS) is a method of staged surgical excision of skin cancer based on a full analysis of histological margins, conducted mostly in “intraoperative” procedure. Fast preparation of histological sections, demonstrating the whole surgical margin (lateral and deep), requires special handling, starting with mode of surgical excision, through topographical marking of specimens, their division, to all steps of histological processing. Authors, employing the Mohs Micrographic Surgery in “fresh tissue” version (frozen sections) for many years, present and discuss a number of solutions applied in this field. Particularly, the construction and operation of the own-patented, laboratory apparatus, allowing for simple and precise execution of large histological sections in MMS is discussed.

**Forum Derm. 2015; 1: 1, 6–11**

**Key words:** Mohs micrographic surgery, frozen sections technique, fresh tissue technique, histological tissue processing, histological technique

### WPROWADZENIE

Niezbędnym etapem preparatyki histologicznej umożliwiającym skrajanie tkanek jest ich utwardzenie. Najszybciej dochodzi do niego w wyniku zamrożenia, czyli przekształcenia zawartej w tkankach wody w kryształki lodu. Wielkość i liczba kryształków jest uzależniona od szybkości procesu zamrażania — im jest szybszy (a temperatura niższa), tym wielkość kryształków jest mniejsza, ale więcej się tworzy ośrodków krystalizacji. Są to warunki pożądane, ponieważ zbyt duża wielkość kryształków powoduje uszkodzenia struktury tkanki [1, 2]. Utwardzanie tkanek odbywa się bez poprzedzającej procedury przygotowawczej (utrwalania,

odwadniania itd.), niezbędnej w technikach bloczków parafinowych, celoidynowych bądź żywicznych [2, 3].

Preparaty histologiczne w technice skrawków mrożonych cechują się nieco niższą jakością w porównaniu do skrawków parafinowych, dlatego nie są stosowane rutynowo. Są jednak z powodzeniem wykorzystywane w badaniach śródoperacyjnych, pozwalających na rozpoznanie zmiany patologicznej (głównie guza nowotworowego z intencją doboru odpowiedniego zakresu wycięcia i ewentualnego leczenia uzupełniającego) lub diagnostykę marginesów wycięcia chirurgicznego (pod kątem obecności nacieków chorobowych, np. nacieków nowotworu lub innych patolo-

### Adres do korespondencji:

*mgr Maria Kozioł, Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 1, 50–368 Wrocław, tel.: +48 71 784 23 23, e-mail: maria.kozioł@umed.wroc.pl*

gii, jak choroba Hirschsprunga). Biorąc pod uwagę dużą odpowiedzialność, jaka się wiąże z wykonywaniem takich badań, ważne jest zapewnienie im możliwie wysokiej jakości. Składają się na nią: zachowanie struktury przypominającej tkankę żywą (brak uszkodzeń mechanicznych i termicznych, np. powodowanych rozerwaniem przez kryształy lodu), zabarwienie umożliwiające odróżnienie poszczególnych składowych mikrostruktury tkanki oraz duża przejrzystość. Technika skrawków mrożonych uchodzi za trudną i niepewną. Uzyskanie preparatów wysokiej jakości jest możliwe jedynie w warunkach optymalnej obróbki histologicznej. Konieczne jest przy tym odpowiednie wyposażenie laboratoryjne oraz doświadczenie technika histologicznego, pozwalające na uniknięcie licznych możliwych błędów.

Od kilku dziesięcioleci w wielu krajach pracuje się metodą etapowego leczenia chirurgicznego nowotworów skóry z histopatologicznym monitorowaniem śródoperacyjnym marginesów wycięcia, zwaną chirurgią mikrograficzną Mohsa (MMS, *Mohs micrographic surgery*) [4]. Jedynym szpitalem w Polsce, w którym jest ona stosowana (od 1994 r.), jest Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Metoda MMS pozwala na wycięcie nowotworów z optymalnym marginesem, co zapewnia zarówno wysoką wyleczalność, jak i zaoszczędzenie tkanek zdrowych. Stosowany margines wycięcia jest najczęściej zróżnicowany w różnych kierunkach, jego szerokość i głębokość są określane na podstawie pełnych badań histopatologicznych granic wycięcia. Omawiana metoda jest wykorzystywana głównie w rakach skóry wysokiego ryzyka agresji lub nawrotu, na przykład w niektórych postaciach raka podstawnokomórkowego. Ponieważ leczenie jest często wieloetapowe, pożądane jest stosowanie szybkich technik histologicznych, przede wszystkim preparatyki skrawków mrożonych.

Preparaty histologiczne w MMS obrazują cały margines chirurgiczny. W tym celu wycięcie nowotworu odbywa się najczęściej skośnie (tzw. wycięcie talerzykowate), a wypukłą powierzchnia marginesu chirurgicznego (skośnie wycięte brzegi i dno) jest przekształcana w powierzchnię płaską. Dzięki temu zabiegowi brzegi preparatu (zawierające najczęściej naskórek i skórę właściwą) znajdują się w jednej płaszczyźnie z jego dnem (zawierającym np. tkankę podskórną czy mięśniową), co umożliwia ich zobrazowanie histologiczne w jednym, najczęściej rozległym skrawku. Takie ukształtowanie wyciętej tkanki uzyskuje się podczas zamrażania, poprzez dokładne dociśnięcie jej dolnej powierzchni do płaskiego podłoża. Niezbędne jest równoległe ułożenie powierzchni zamrożonej już tkanki do płaszczyzny tnącej noża kriostatu, co pozwala na uzyskanie pełnych skrawków z najbardziej powierzchniowych warstw błoczka. Jeżeli powierzchnia marginesu chirurgicznego jest za duża na zobrazowanie w postaci pojedynczego skrawka (o wy-

miarach ograniczonych wielkością szkiełka podstawowego), preparat chirurgiczny należy podzielić na kilka ściśle oznakowanych fragmentów, z których każdy stanowi materiał na osobny preparat histologiczny. Tak określone wymagania powodują, że wykonanie prawidłowych skrawków mrożonych w MMS jest znacznie trudniejsze niż w przypadku rutynowych badań śródoperacyjnych. Wszelkie niedokładności preparatów histologicznych mogą prowadzić do wytworzenia skrawków niekompletnych (nieodzwierciedlających całego marginesu chirurgicznego) i do generowania wyników fałszywie ujemnych, co zmniejsza skuteczność metody MMS. Inne problemy stwarza uzyskanie skrawków kompletnych, ale skrojonych zbyt głęboko od powierzchni błoczka; co z kolei może dawać wyniki fałszywie dodatnie i skutkować koniecznością wykonania kolejnego etapu wycięcia, co tym samym prowadzi do niepotrzebnej utraty tkanek. Jak więc wynika z powyższego, dokładność preparatów histologicznych ma kluczowe znaczenie dla skuteczności MMS.

## SPOSOBY ZAMRAŻANIA TKANEK W MMS

Opisywano w MMS różne sposoby zamrażania tkanek, na przykład poprzez zanurzanie w skroplonych gazach lub natryskiwanie rozprężającymi się gazami. Ze względu na dobre właściwości zamrażające i niski koszt, najczęściej stosuje się ciekły azot. Istnieje jednak ryzyko, że wytwarzająca się w kontakcie z tkanką frakcja gazowa może opłaszczać tkanki, blokując ich dalsze zamrażanie [5]. Do rzadziej stosowanych środków kriogenicznych należą izopentan lub dwutlenek węgla [2, 3, 5, 6]. Spośród wielu metod zamrażania tkanek w MMS najczęściej wykonuje się zetknięcie tkanek z zimnymi elementami wnętrza kriostatu. Niezależnie od przyjętej metody zamrażania, ważne znaczenie dla jakości skrawków jest wstępne osuszenie tkanki gazikiem. Ze względu na konieczność uzyskiwania rozległych preparatów w MMS wskazane jest zatapianie tkanek w mediach najwyższej jakości wytwarzanych na bazie żywic [6].

Wielu specjalistów MMS opracowało własne sposoby obróbki tkanek. Można je podzielić na: wykorzystujące zamrażające działanie kriostatu oraz stosowane poza kriostatem. Wszystkie prowadzą do powstania błoczka z zamrożonej tkanki i medium, umieszczonego na stoliku i podlegającego skrajaniu w mikrotomie kriostatu.

Najprostsze metody wykorzystują działanie zamrażające samego kriostatu. Część z nich nie wymaga dodatkowego wyposażenia; należą do nich: technika bezpośrednia, technika szkiełka podstawowego, technika półki szybkiego zamrażania. Inne wykorzystują proste urządzenia umieszczone w komorze kriostatu, takie jak: urządzenie Cartera, system Cryoembedder i system Petersa.

**Technika bezpośrednia** (*direct method*) jest stosowana w MMS najczęściej. Tkaneczka jest układana płaszczyzną wycięcia chirurgicznego ku górze w zamrażającym medium na-

łożonym na stolik umieszczony w otworze „półki szybkiego zamrażania” kriostatu. W celu odpowiedniego uformowania brzegi tkanki są unoszone pęsetą ku górze w taki sposób, by brzeg naskórkowy znajdował się na tej samej wysokości co środek preparatu. Następnie bezpośrednio przed całkowitym zamrożeniem tkanki wraz z medium są uciskane i spłaszczane ewakuatorem ciepła [6–8].

W **technice półki szybkiego zamrażania** (*freezing bar technique*) tkanka jest umieszczana na półce płaszczyzną wycięcia chirurgicznego ku dołowi i w ten sposób szybko zamrażana, przy jednoczesnym dociskaniu jej brzegów i dna. Następnie jest podważana, odwracana i wklejana w marznące medium umieszczone na stoliku kriostatu, zwykle z wykorzystaniem docisku ewakuatora ciepła [8].

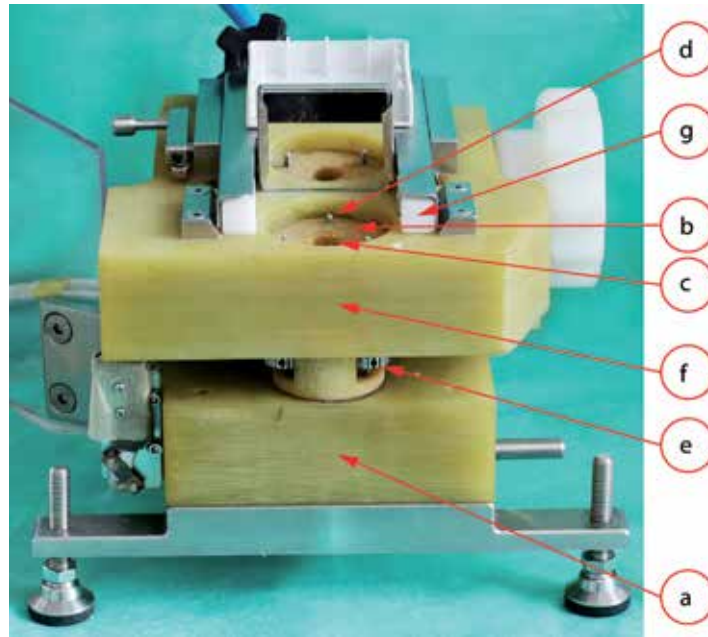
W **technice szkiełka podstawowego** (*glass slide method*) tkanka jest układana na szkiełku podstawowym płaszczyzną wycięcia chirurgicznego ku dołowi (w sposób typowy dla MMS wykorzystywany w znacznej części metod) [6, 8–10]. Następnie preparat jest przenoszony do kriostatu, gdzie rozpoczyna się zamrażanie, podczas którego tkanki są dociskane i spłaszczane [7]. Po zamrożeniu tkanka jest obracana w dół (szkiełkiem do góry) i wklejana w zamarzające medium na stoliku. Technika ta podlegała różnym modyfikacjom, w których szkiełko zastępowano fragmentem błony ze zdjęć rentgenowskich lub plastikowymi wanienkami (*cryomolds*) [8, 10, 11].

**Urządzenia Cartera, CryoEmbedder i Precision Cryoembedding System** to konstrukcje do zastosowania wewnątrz kriostatu, zbudowane z masywnych bloków metalowych o dużej pojemności cieplnej. Mają równą płaszczyznę służącą do spłaszczania i zamrażania tkanek oraz umożliwiają ich bloczkowanie równoległe do powierzchni stolika. **Urządzenie Cartera** składa się z dwóch metalowych bloków, łączących się równoległe za pomocą czterech trzpieni z gniazdami na stoliki kriostatu. Na jeden ze stolików (o zeszlifowanej powierzchni) nakłada się tkankę, następnie — przy zastosowaniu ucisku — zamraża się ją i umieszcza wraz ze stolikiem w gnieździe górnej płyty. Zwykły stolik kriostatu osadzony w gnieździe dolnej płyty jest pokrywany medium, po czym obie płyty zostają złączone, tym samym wklejając tkankę w medium [12]. **Urządzenie CryoEmbedder** (firmy Klinipath) ma bardzo podobną konstrukcję, z tą różnicą, że bloki łączą się za pomocą dwóch (a nie czterech) trzpieni, a zamrażanie tkanki odbywa się bezpośrednio na jednym z dwóch bloków metalowych [13]. Z kolei system **Precision Cryoembedding Petersa** pozwala na zamrażanie tkanek w kriostacie na dnie metalowych wanienek o spłaszczonej powierzchni [14].

Najprostsze metody obróbki wykorzystują poza kriostatem także narzędzia podtrzymujące tkankę i zamrażające ją poprzez zanurzenie w azocie. Należą do nich kleszcze Miami

special i system Davidson Cryocups. **Metalowe kleszcze Miami special** są zaopatrzone w dwie równoległe blaszki; na jednej z nich rozkładana jest tkanka powierzchnią wycięcia ku dołowi. Do otworu w drugiej blaszce wprowadzany jest stolik kriostatu pokryty warstwą medium. Po ściśnięciu kleszcze są zanurzane w ciekłym azocie, w efekcie po kilku sekundach uzyskiwane jest pełne zamrożenie tkanki [10, 15–17]. Podstawowym elementem systemu **Davidson Cryocups** jest metalowy pojemnik, na dnie którego rozkładana jest tkanka, następnie jest zalewana medium, dociskana stolikiem kriostatu, unieruchamiana pokrywą dociskową i zanurzana w azocie, w większym zbiorniczku o długim trzonku [17, 18].

Opracowano też liczne **złożone urządzenia przeznaczone do pracy poza kriostatem**. Są to urządzenia Koehna, Motleya i Holta, Mariniego, Gormleya, Franksa, Cryohist, a także urządzenie własnej konstrukcji [19]. **Urządzenie Koehna** to rozwinięcie opisywanego wyżej urządzenia Cartera, w którym zamrażanie tkanki na zeszlifowanym stoliku odbywa się poza kriostatem, na specjalnym gnieździe umieszczonym nad dyszą azotu [20]. **Urządzenie Motleya i Holta** ma postać pionowego, plastikowego cylindra z doprowadzoną od spodu dyszą azotu, gniazdem na stolik kriostatu i wycięciem na szkiełko podstawowe. Tkanka jest układana na szkiełku i zamrażana w strumieniu azotu. Po zamrożeniu stolik kriostatu umieszcza się w gnieździe nad dyszą azotu, preparat obrócony ku dołowi jest wklejany podczas ponownego natryskiwania azotu w marznące medium stolika [21]. Dokładniejszą modyfikacją tego urządzenia jest **aparatus „cryosystem” Mariniego**, zbudowany z dwóch współśrodkowych cylindrów: wewnętrznego (z wylotem azotu i gniazdem na stolik kriostatu) i zewnętrznego (z uchwytem na szkiełko podstawowe) [22]. Jednym z pierwszych urządzeń zamrażających tkanki poza kriostatem było **urządzenie Gormleya** o konstrukcji kolumnowej, wykorzystujące zamrażanie w natrysku dwutlenku węgla. Tkankę rozkładano, formowano i zamrażano na metalowym cylindrze (chłodzonym przepływem gazu), następnie wklejano ją za pośrednictwem medium w stolik osadzony na pionowej, ruchomej dźwigni [23]. Podobne konstrukcyjnie jest **urządzenie Franksa** – jest ono zbudowane z kolumny, z gniazdem na stolik kriostatu i przesuwnym uchwytem szkiełka [24]. Tkankę umieszcza się na szkiełku i zamraża w strumieniu azotu, następnie szkiełko osadza się (tkanką na dół) w uchwycie, obniża i wkleja w stolik z zamarzającym medium, zamocowany w dolnej części. Najbardziej rozbudowany jest aparat **Cryohist**, w którym tkanki są rozkładane na metalowych dyskach, pokrywane folią i spłaszczane samostatnie w wyniku wytwarzanego podciśnienia i nacisku folii. Zamrażanie tkanek zachodzi dzięki schłodzeniu dysków, a ich wklejanie odbywa się poprzez zamknięcie pokrywy, w której są osadzone stoliki [17, 18].



**Rycina 1.** Aparat laboratoryjny własnej konstrukcji do kształtowania i zamrażania tkanek w MMS. Podstawowe elementy urządzenia są zbudowane z tworzywa odpornego na odkształcenie w niskich temperaturach: (a) podstawa, (b) cylinder z (c) dyszą azotu i (d) gniazdem na stolik kriostatu złożonym z trzech śrub, których wysokość jest regulowana za pomocą (e) pokręteł, (f) półka z (g) dociskiem na szkiełka mikroskopowe; MMS (*Mohs micrographic surgery*) — chirurgia mikrograficzna Mohsa

W laboratorium Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu było stosowanych wiele z powyżej opisanych metod i urządzeń, jak również obserwowano szczegóły techniki histologicznej w licznych zagranicznych laboratoriach MMS. Jednak od kilku lat są tu używane wyłącznie **urządzenia własnej konstrukcji, opatentowane przez Andrzeja Bieńka i Janusza Szymkowskiego** (Wniosek do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej Nr P398733 z dnia 05.04.2012 zgłoszony przez Politechnikę Wrocławską). Jest ono zbudowane z podstawy, w której są osadzone cylinder oraz kolumna. Na niej znajduje się ruchoma półka z uchwytem na szkiełka mikroskopowe (ryc. 1). Podobnie jak w większości podobnych konstrukcji tkanka jest rozkładana na szkiełku płaszczyzną cięcia w dół, formowana przez ucisk i jednocześnie zamrażana. Następnie szkiełko jest zdejmowane, w gnieździe umieszcza się stolik kriostatu, a szkiełko — po obróceniu tkanką w dół i ponownym osadzeniu w uchwycie — jest obniżane na marznące medium rozprowadzone na stoliku.

Unikalną cechą urządzenia jest możliwość precyzyjnej regulacji płaszczyzny bloczka tkankowego w stosunku do płaszczyzny tnącej noża mikrotomu, niezależnie od ustawienia stolika w kriostacie. Jest to szczególnie ważne w kriostatach o zmiennym ułożeniu stolika, ponieważ umożliwia wspólne użytkowanie przez różnych techników laboratoryjnych i eliminuje konieczność ręcznego ustalania położenia

bloczka podczas skrajania. Także kriostaty o stałym położeniu uchwytu stolika mogą prezentować znaczne różnice ustawienia. W takich sytuacjach pełne skrajanie tkanek z najbardziej powierzchniowych warstw bloczka jest bardzo trudne; problem ten nie został jednak wcześniej rozwiązany. Położenie płaszczyzny bloczka reguluje się za pomocą pokręteł, poprzez zmianę wysokości dwóch (spośród trzech) śrub, na których osadzony jest stolik. Taka regulacja jest konieczna po każdorazowej zmianie położenia uchwytu stolika w kriostacie (np. przez innych użytkowników) lub po wykonaniu kilkunastu bloczków, w celu skorygowania ewentualnego „rozkalibrowania” urządzenia. Wartości koniecznego przesuwu pokręteł są wyliczane i podawane przez aplikację komputerową na podstawie pomiarów dokonywanych podczas skrajania tzw. bloczka próbnego (czyli bloczka z samego medium, bez tkanki). Czynności te są wykonywane w następujący sposób: na stolik umieszczony w gnieździe urządzenia nakrapiane jest medium, następnie (przy jednoczesnym zamrażaniu azotem) opuszcza się półkę z zamontowanym szkiełkiem uciskającym medium i wytwarzającym równą powierzchnię „bloczka próbnego”. Po zamrożeniu i usunięciu szkiełka bloczek próbny jest umieszczany w uchwycie kriostatu i skrajany na grubość 10 µm. Podczas skrajania należy zebrać następujące dane: a) położenie punktu na obwodzie bloczka, od którego rozpoczyna się jego cięcie (określane godzinowo) (punkt A), b) najmniejszą głębokość, na której uzyskiwany jest pełny

skrawek obejmujący całą powierzchnię bloczka, c) średnicę bloczka pomiędzy punktem A a punktem przeciwnym, w którym kończy się cięcie pełnego skrawka (punkt B). Dane te, uzyskane w czasie nieprzekraczającym zwykle minuty, są wprowadzane do aplikacji komputerowej, która natychmiast podaje liczbę i kierunek obrotów pokręteł, koniecznych do „idealnie równoległego” ułożenia płaszczyzny bloczka tkankowego w stosunku do płaszczyzny tnącej noża. Po nastawieniu pokręteł urządzenie jest właściwie skalibrowane i gotowe do pracy z tkanką [19]. Dzięki możliwości zastosowania szkiełek podstawowych o podwójnej szerokości, a także stolików o średnicy 4–5 cm, urządzenie zezwala na wykonanie bardzo dużych skrawków.

### PRZYGOTOWANIE PREPARATÓW

Pożądana temperatura cięcia skrawków w przypadku większości tkanek mieści się w zakresie od  $-19^{\circ}\text{C}$  do  $-25^{\circ}\text{C}$ . Zwijaniu skrawków można zapobiec, stosując płytkę anti-roll, prostując je delikatnie pędzelkiem bądź wykorzystując odpowiednie media [1, 6]. Uważa się, że najbardziej optymalne jest cięcie preparatów na grubość  $5\ \mu\text{m}$  [1, 3]. W MMS ze względu na znaczną wielkość preparatów jest to trudne, ponieważ tak cienkie i rozległe skrawki często się rozpadają. Z tego względu najczęściej stosujemy cięcie na grubość 8–10  $\mu\text{m}$ , co pozwala na zachowanie zwartości skrawka i wystarczająco wysokiej jakości i klarowności preparatów.

Po skrojeniu skrawki są przyklejane na szkiełka podstawowe. Według wielu specjalistów najlepiej stosować szkiełka o podwyższonej wiązalności, o specjalnie opłaszczonych powierzchniach (pokrytych np. L-lizyną bądź aminopropylkrzemianem) [3, 6]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku tkanek utrwalanych wcześniej (np. w formalinie), które łatwo ulegają spłukaniu podczas barwienia [1]. Autorzy z powodzeniem stosują także szkiełka zwykłe, pod warunkiem ich dokładnego odtłuszczenia. W celu uzyskania miarodajnych preparatów niezbędne jest też właściwe zabarwienie skrawków. W MMS wykorzystuje się najczęściej barwienie hematoksyliną i eozyną (HE), rzadziej — błękitem toluidyny [3, 6]. Ze względu na konieczność jak najwcześniejszej diagnostyki, dąży się do możliwie najszybszego przeprowadzenia barwienia. Obecnie autorzy stosują opracowany przez siebie szybki szereg barwienia HE, trwający nieco poniżej 5 minut.

### DYSKUSJA

W MMS prawidłowe przygotowanie tkanek do skrajania w kriostacie jest najtrudniejszym elementem całej obróbki histologicznej. Składają się na to trzy elementy: 1) konieczność uformowania tkanki podczas zamrażania, czyli nadania wypukłej płaszczyźnie marginesu chirurgicznego kształtu płaszczyznowego, 2) zamrożenie tkanki

bez uszkodzeń termicznych i 3) skrojenie tkanek na pełnej powierzchni preparatu i jednocześnie na jak najmniejszej głębokości w stosunku do powierzchni bloczka. Dokładne uformowanie płaszczyzny tkanki jest możliwe jedynie pod kontrolą wzroku, w warunkach dobrego oświetlenia i łatwego dostępu. Wiele metod zapewnia wystarczającą precyzję tego etapu; znaczna ich część utrudnia jednak uzyskanie optymalnych preparatów, a dotyczy to w szczególności metod obróbki wewnątrz kriostatu. Istnieją różne opinie dotyczące jakości tkanek mrożonych w kriostacie, w porównaniu do zamrażania azotem [6]. Uważa się, że mrożenie zbyt wolne (np. w niewystarczająco zimnym kriostacie) powoduje wytrącanie śródkomórkowe kryształów lodu, a zbyt szybkie (np. poprzez zanurzenie w azocie) — kruchość tkanki i jej rozrywanie podczas skrajania. Według doświadczeń autorów kontrolowane zamrażanie natryskiem azotu pozwala na skrajanie tkanki bez jej skruszenia, a także na uzyskanie preparatów dobrej jakości. Warunkiem jest jednak unikanie przemrażania i rozmrażania tkanek. Zdaniem autorów uzyskanie najwyższej dokładności ułożenia bloczka w stosunku do powierzchni stolika kriostatu jest możliwe jedynie przy zastosowaniu najbardziej precyzyjnych urządzeń.

Opierając się na własnych doświadczeniach, autorzy stwierdzili, że wymogi specyficznej preparatyki histologicznej w MMS najlepiej spełnia urządzenie laboratoryjne własnego pomysłu. Umożliwia ono łatwe i szybkie wykonanie rozległych skrawków z pełnego przekroju bloczka tkankowego na nieznacznej głębokości od jego powierzchni, niezależnie od ustawienia stolika kriostatu, bez konieczności jego ręcznej regulacji.

### PIŚMIENNICTWO

1. Lester S.C., Cassarino D.S., Folkerth M.D. i wsp. Diagnostic Pathology: Intraoperative Consultation. Methods. Amirsys. Salt Lake. 2013; 24–37.
2. Litwin J.A., Gajda M. Podstawy technik mikroskopowych. Wydaw. Uniwersytetu Jagiellońskiego. Kraków 1999; 33–76.
3. Bancroft J.D., Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6. pub. Churchill Livingstone Elsevier. London 2008.
4. Bieniek A., Wąsik F., Cisło M. i wsp. Chirurgia mikrograficzna — przegląd metod. Przegł. Dermatol. 1997; 84: 453–462.
5. Steu S., Baucamp M., Dach G. i wsp. A procedure for tissue freezing and processing applicable to both intra-operative frozen section diagnosis and tissue banking in surgical pathology. Virchows Arch. 2008; 452: 305–312.
6. Miller L.J., Argenyi Z.B., Whitaker D.C. The preparation of frozen sections for Mohs micrographic surgery. A review of current methodology. J. Dermatol. Surg. Oncol. 1993; 19: 1023–1029.
7. Weber P.J., Moody B.R., Dryden R.M., Foster J. Mohs surgery and processing: novel optimizations and enhancements. Dermatol. Surg. 2000; 26: 909–914.
8. Yob E.H. Cryostat and cryostat technique. Obtaining Quality Mohs Slides. W: Gross K.G., Steinmann H.K., Rapini R.P. (red.). Mohs Surgery. Fundamentals and Techniques. Mosby. St Louis. Baltimore Boston 1999.
9. Dogan M.M., Snow S.N., Jacob L.O. Rapid skin edge elevation using the OCT compound droplet technique to obtain horizontal microsections in Mohs micrographic surgery. J. Dermatol. Surg. Oncol. 1991; 17: 857–860.

10. Silapunt S., Peterson R., Alcalay J., Goldbeg L.H. Mohs tissue mapping and processing: a survey study. *Dermatol. Surg.* 2003; 29: 1109–1112.
11. Leshin B., Cook S.R., Frye D.W. Cryomold: a device for tissue embedding in Mohs micrographic surgery. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1991; 17: 234–236.
12. Carter V.H. A new method for preparing tissue blocks for cryostat sectioning. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1985; 11: 687–689.
13. Beck B., Peters S.R. Frozen Section Techniques Used in Mohs Micrographic Surgery. W: Peters S.R. (red.). *A Practical Guide to Frozen Sections Technique*. Springer Science + Business Media LLC. New York 2010; 151–190.
14. Esinger W. Face-down cryoembedding in Clinical histopathology: The art of embedding tissue for cryosectioning. Leica Microsystems. Clinical Note 2014. [http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20CM1950/Publications/Face\\_Down\\_Cryoembedding.pdf](http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20CM1950/Publications/Face_Down_Cryoembedding.pdf)
15. Hanke C.W., Lee M.W. Cryostat use and tissue processing in Mohs micrographic surgery. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1989; 15: 29–32.
16. Hanke C.W., Menn H., O'Brien J.J. Chemosurgical reports: frozen-section processing with the Miami Special. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1983; 9: 260–262.
17. Hanke C.W., Leonard A.L., Reed A.J. Rapid preparation of high quality frozen sections using a membrane and vacuum system embedding machine. *Dermatol. Surg.* 2008; 34: 20–25.
18. Bakhtar O., Close A., Davidson T.M., Baird S.M. Tissue preparation for MOHS' frozen sections: a comparison of three techniques. *Virchows Archiv.* 2007; 450: 513–518.
19. Bieniek A. Własne modyfikacje chirurgii mikrograficznej Mohsa w leczeniu nowotworów skóry. Praca habilitacyjna, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, 2012.
20. Koehn G.G. A new modification for preparing tissue blocks for cryostat sectioning. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1992; 18: 485–486.
21. Motley R.J., Holt P.J. A simple device for optimal tissue preparation for Mohs micrographic surgery. *Br. J. Dermatol.* 1992; 126: 57–59.
22. Marini L. Cryosystem: a new, complete device for tissue processing in micrographic surgery. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 1995; (supl.) 1: 117.
23. Gormley D.E. Evaluation of a method for controlled tissue embedding for histologic evaluation of tumor margins. *Am. J. Dermatopathol.* 1987; 9: 308–315.
24. Franks J.W. A precision machine for mounting tissues for Mohs micrographic surgery. *Dermatol. Surg.* 1998; 24: 989–983.