

Dr n. med. Krzysztof Gil  
Katedra Patofizjologii  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
[mpgil@cyf-kr.edu.pl](mailto:mpgil@cyf-kr.edu.pl)

## AUTOREFERAT

### informujący o zainteresowaniach i osiągnięciach w działalności naukowej, dydaktycznej oraz organizacyjnej.

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**1985-1991** studia na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Krakowie, ukończone dnia 27 czerwca 1991 – lekarz medycyny

**2001** stopień doktora nauk medycznych uzyskany 18 maja 2001 na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Cytoimmunologiczna charakterystyka zmian w płucach wywołanych pyłami krzemu i azbestu*”

**2007** specjalizacja pierwszego stopnia w zakresie chorób wewnętrznych

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

**01.10.1991- 30.09.1992** obowiązkowy staż lekarski – Akademia Medyczna w Krakowie

**01.10-1991 – 30.09.2002** asystent w Katedrze Patofizjologii Collegium Medicum UJ

**lipiec 2002- sierpień 2003** research fellowship w Houston Medical School (Texas, USA); Department of Integrative Biology and Pharmacology.

**01.10.2002 – 28.02.2012** adiunkt w Katedrze Patofizjologii Collegium Medicum UJ

**od 01.03.2012 – obecnie** starszy wykładowca w Katedrze Patofizjologii Collegium Medicum UJ

3. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

**„Zastosowanie obwodowej stymulacji nerwu błędnego w regulacji przyjmowania pokarmu” w oparciu o jednotematyczny cykl publikacji.**

1. Bugajski AJ, Gil K, Ziomber A, Zurowski D, Zaraska W, Thor PJ.: Effect of long-term vagal stimulation on food intake and body weight during diet induced obesity in rats. J Physiol Pharmacol. 2007;58 Suppl 1:5-12. **IF: 4.466**

2. Gil K, Bugajski A, Kurnik M, Zaraska W, Thor P: Physiological and morphological effects of long-term vagal stimulation in diet induced obesity in rats. J Physiol Pharmacol. 2009, 60, Suppl 3, 61-66. **IF=1.489**

3. Gil Krzysztof, Bugajski Andrzej, Skowron Beata, Thor Piotr: Increased c-Fos expression in nodose ganglion in rats with electrical vagus nerve stimulation. Folia Medica Cracoviensia 2011, 51, 1-4: 45-58. **MNiSW: 4**

4. Gil K, Bugajski A, Thor P: Electrical vagus nerve stimulation decreases food consumption and weight gain in rats fed high-fat diet. J Physiol Pharmacol. 2011, 62; 637-646. **IF=2.267**

5. Gil K, Bugajski A, Kurnik M, Thor P: Chronic vagus nerve stimulation reduces body fat, blood cholesterol and triglyceride levels in rats fed a high-fat diet. Folia Medica Cracoviensia 2012, LII (52), 3-4: 79-96. **MNiSW: 4**

6. Gil K, Bugajski A, Kurnik M, Thor P: Electrical chronic vagus nerve stimulation activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats fed high-fat diet. Neuroendocrinol Lett 2013; 34(4):101–108. **IF= 1.296**

Łączny *impact factor* w/w prac: **9.518 pkt.**

**Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Nerw błędny (*Nervus Vagus*, nerw X), najdłuższy nerw czaszkowy, stanowi główną strukturę anatomiczną parasympatycznego układu nerwowego, unerwiając liczne narządy szyi, klatki piersiowej i jamy brzusznej. Prawy i lewy nerw błędny po wyjściu z pnia mózgu przechodzą przez otwory szyjne, następnie zmierzają w okolice szyi współtworząc zwoje guzowate (*ganglion nodosum*), i dalej biegnąc wzdłuż przełyku wchodzą do jamy brzusznej jako dwa pnie (grzbietowy – prawy, brzuszny – lewy). W odcinku podprzeponowym przełyku pnie te dzielą się na kilka gałęzi, unerwiając żołądek, dwunastnicę, jelito cienkie oraz okrężnicę proksymalną aż do zstępującej. Gałąź wątrobowa wspólna nerwu błędnego unerwia wątrobę i trzustkę, a ponadto reguluje perystaltykę pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych.

Pnie nerwu błędnego unerwiającego trzewia składają się głównie z niezmielinizowanych włókien, których ponad 80% ma charakter włókien aferentnych (dośrodkowych), podczas gdy włókna eferentne (odśrodkowe) stanowią pozostałe 20%. Włókna aferentne przewodzą do mózgu informacje z narządów szyi, klatki piersiowej i jamy brzusznej, regulując między innymi przyjmowanie pokarmu oraz odruchy trawienne. Neurony aferentne nerwu błędnego znajdują się w zwojach guzowatych, zbierając, a następnie przynosząc informacje czuciowe do jądra pasma samotnego (*nucleus tractus solitarius* - NTS); stamtąd sygnały przekazywane są do dalszych ośrodków nerwowych, między innymi do podwzgórza. Włókna eferentne nerwu błędnego wychodzą z neuronów leżących w pniu mózgu (*dorsal motor nucleus* – DMX oraz *nucleus ambiguus*), kontrolujących funkcje autonomiczne. NTS wraz z *dorsal motor nucleus* oraz *area postrema* tworzą tzw. *dorsal vagal complex*, który pełni rolę głównego centrum integracyjnego autonomicznego układu nerwowego.

Nerw błędny reguluje częstość akcji serca, ciśnienie krwi, a także motorykę i wydzielanie przewodu pokarmowego. Prawy nerw błędny unerwia węzeł zatokoprzedsienny (odpowiedzialny za funkcję rozrusznikową serca), podczas gdy lewy nerw błędny zaopatruje węzeł przedsionkowo – komorowy (wpływając na siłę skurczu mięśnia sercowego, ale ma mniejszy wpływ na częstość skurczów). Stymulacja nerwu błędnego (*vagus nerve stimulation* - VNS) prawego powoduje znaczne zwolnienie akcji serca, podczas gdy stymulacja lewego nerwu błędnego nie wywiera znaczącego wpływu na częstość skurczów serca. Dlatego zarówno w warunkach eksperymentalnych, jak również w celach terapeutycznych VNS przeprowadza się na lewym nerwie błędnym.

Możliwości wpływania na ośrodki układu nerwowego za pośrednictwem obwodowej stymulacji aferentnych włókien nerwu błędnego spowodowały, że zaczęto prowadzić intensywne badania nad zastosowaniem stymulacji nerwu błędnego jako potencjalnej metody terapeutycznej, między innymi w przypadkach padaczki odpornej na leczenie farmakologiczne, depresji, migreny, fibromialgii, choroby Alzheimera, a w warunkach eksperymentalnych w sepsie, wstrząsie pokrwotocznym, czy zespołach niedokrwienia/reperfuzji.

Waga ciała, spożywanie pokarmu oraz zawartość tłuszczu w organizmie podlegają mechanizmom regulacyjnym, określanym jako krótkotrwała oraz długotrwała regulacja pokarmu. Pokarm dostający się do żołądka, a następnie do dwunastnicy aktywuje chemo- oraz mechanoreceptory, z których sygnały przesyłane są drogą włókien aferentnych nerwu błędnego do ośrodków w tyłomózgowiu, gdzie ulegają dalszej integracji, odgrywając kluczową rolę w mechanizmach tzw. krótkotrwałej regulacji przyjmowania pokarmu, prowadząc do ograniczenia dalszego spożywania pokarmu. W mechanizmach długotrwałej regulacji przyjmowania pokarmu uczestniczą ponadto liczne czynniki humoralne (leptyna,

insulina, grelina, nesfatyna-1, oreksyny, neuropeptyd Y i inne), ale we wszystkich tych mechanizmach istotną rolę odgrywają włókna aferentne nerwu błędnego, przynosząc informacje o stanie sytości do ośrodków centralnych tj. NTS oraz dalej, do ośrodków podwzgórzowych, między innymi do jądra łukowatego podwzgórza (*arcuate nucleus*- ARH).

Założyliśmy, że obwodowa, elektryczna stymulacja nerwu błędnego, poprzez przesyłanie sygnału „imitującego” sygnały sytości przekazywane w warunkach fizjologicznych z przewodu pokarmowego do mózgu, może aktywować neurony w NTS oraz podwzgórzu, powodując osiągnięcie stanu odczuwania sytości i spowodować ograniczenie przyjmowania pokarmu. Ponieważ włókna aferentne przynoszą informacje do mózgu nie tylko z aktywowanych mechanoreceptorów przewodu pokarmowego, ale także chemoreceptorów dwunastniczych, glukoreceptorów wątrobowych oraz osmoreceptorów, nasza hipoteza wydawała się mieć uzasadnione podstawy teoretyczne.

W ramach obszernych prac nad dekodowaniem i modulacją nerwu błędnego prowadzonych w Katedrze Patofizjologii CM UJ skoncentrowałem się na badaniu wpływu przewlekłej elektrycznej stymulacji nerwu błędnego na przyjmowanie pokarmu. Powstały podczas realizacji tych badań cykl monotematycznych publikacji oryginalnych stanowi podstawę prezentowanej przez mnie pracy habilitacyjnej (celu naukowego).

**1. Bugajski AJ, Gil K, Ziomber A, Zurowski D, Zaraska W, Thor PJ.: Effect of long-term vagal stimulation on food intake and body weight during diet induced obesity in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58 Suppl 1:5-12.**

Badania prowadziliśmy na dorosłych szczurach (samcach) szczepu Wistar odżywianych dietą bogatą w tłuszcze. Używaliśmy dorosłych szczurów, aby wyeliminować efekty zmiany wagi spowodowane wzrastaniem, dzięki czemu mierzone przyrosty wagi ciała zmieniały się liniowo, natomiast zastosowanie diety wysokotłuszczowej (ponad 40% kalorii pochodzących z tłuszczu) jest uznanym modelem wywoływania otyłości i zaburzeń metabolicznych u szczurów, ponieważ przypomina otyłość rozwijającą się u ludzi.

Zwierzętom, po niezbędnym okresie adaptacji, wszczepiano mikrostimulator zasilany bateryjnie, generujący impulsy elektryczne o zadanej częstotliwości, podłączony poprzez platynowe elektrody do lewego nerwu błędnego. Wybraliśmy model stymulacji lewego nerwu błędnego. Chociaż niektóre wcześniejsze badania wskazywały, że stymulacja obustronna może być bardziej skuteczna, to aby uniknąć działań niepożądanych (zaburzenia oddechowe i rytmu serca) zdecydowaliśmy o użyciu modelu stymulacji lewostronnej. Mikrostimulatory do badań zostały zaprojektowane we współpracy z naszą Katedrą, natomiast wykonane i zaprogramowane przez Instytut Techniki Elektronowej w Krakowie. Częstotliwość stymulacji

ustalono w oparciu o nasze dotychczasowe próby dekodowania informacji o sytości przewodzonych przez nerwy błędne (w tym badaniu - czas impulsu 10 ms, amplituda 200 mV, częstotliwość 0,05 Hz). Eksperyment trwał 102 dni i dostarczył bardzo interesujących danych. Przewlekła stymulacja lewego nerwu błędnego spowodowała zmniejszenie ilości spożywanego pokarmu, spadek przyrostu masy ciała oraz obniżoną zawartość trzewnej tkanki tłuszczowej. W celu oceny zawartości tkanki tłuszczowej trzewnej wprowadziliśmy pomiar wagi tzw. FAT – padów (najądrzowej tkanki tłuszczowej). Wówczas metoda ta była mało znana, a obecnie badanie to jest powszechnie stosowane do oceny otluszczenia zwierząt eksperymentalnych. Pomimo, że FAT-pad jest niewielki, to podlega tym samym ogólnoustrojowym procesom regulacyjnym, co tkanka tłuszczowa trzewna, jest stosunkowo łatwy do pobrania, a jego masa dobrze odzwierciedla stopień gromadzenia tłuszczu w ustroju. W grupie zwierząt poddanych stymulacji stwierdziliśmy znaczący spadek zawartości tkanki tłuszczowej w stosunku do masy szczura. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie takiego modelu eksperymentalnego elektrostymulacji jest bardzo celowe. Natomiast osiągnięcie bardziej znaczących efektów w zakresie przyjmowania pokarmu i wagi ciała może wymagać dostosowania parametrów stymulacji nerwu błędnego (38).

**2. Gil K, Bugajski A, Kurnik M, Zaraska W, Thor P: Physiological and morphological effects of long-term vagal stimulation in diet induced obesity in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2009, 60, Suppl 3, 61-66**

W kolejnym eksperymencie zadaliśmy sobie pytanie, czy obserwowane zmiany metabolizmu, tzn. spadek przyjmowania pokarmu, zahamowanie przyrostu masy ciała oraz zmniejszone gromadzenie tkanki tłuszczowej są skutkiem aferentnej stymulacji nerwu błędnego, czy może także wynikają z uruchomienia mechanizmów obwodowych. W tym celu przeprowadziliśmy kolejną serię badań na szczurach, stosując opisany uprzednio model elektrostymulacji nerwu błędnego. Po jego zakończeniu pobraliśmy wycinki ze ściany żołądka, jelita cienkiego oraz proksymalnej części jelita grubego, w których immunohistochemicznie uwidacznialiśmy neurony splotu śródmięśniowego (Auerbacha), komórki śródmiąższowe Cajala oraz komórki tuczne (mastocyty, które to komórki uczestniczą w interakcjach neuro – immunologicznych). Badaliśmy te komórki, ponieważ pełnią one funkcje regulatorowe w motoryce przewodu pokarmowego i nawet niewielkie ich uszkodzenia mogą skutkować istotnymi zaburzeniami trawienia i wchłaniania pokarmu. Ocenialiśmy także dobrostan zwierząt, u których nie stwierdziliśmy żadnych odchyśleń w grupie zwierząt poddanych stymulacji w stosunku do grupy kontrolnej.

Przewlekła stymulacja lewego nerwu błędnego nie spowodowała istotnych zmian komórek spłotu śródściennego ani śródmiaższowych komórek Cajala w żadnym z badanych fragmentów ściany przewodu pokarmowego. Stwierdziliśmy natomiast znaczący wzrost liczby komórek tucznych w żołądku u szczurów stymulowanych, szczególnie widoczny w warstwie mięśniowej, wskazujący, że nie da się całkowicie wykluczyć pewnego efektu eferentnego (odśrodkowego) stymulacji nerwu błędnego. Dlatego, aby sprawdzić i potwierdzić aferentny charakter i skuteczność zastosowanej metody elektrostymulacji, postanowiliśmy przeprowadzić kolejną serię eksperymentów (41).

**3. Gil Krzysztof, Bugajski Andrzej, Skowron Beata, Thor Piotr: Increased c-Fos expression in nodose ganglion in rats with electrical vagus nerve stimulation. *Folia Medica Cracoviensia* 2011,51, 1-4: 45-58**

Wyniki poprzednich eksperymentów z zastosowaniem VNS u szczurów odżywianych dietą wysokotłuszczową były zachęcające, ale wskazały na konieczność weryfikacji skuteczności zastosowanej metody VNS. Chociaż obserwowaliśmy spadek wagi, spożycia pokarmu oraz zmniejszone gromadzenie tkanki tłuszczowej po VNS, to brakowało nam jednoznacznych dowodów, że zastosowana stymulacja ma faktycznie charakter aferentny. Dlatego zawsze przed wszczęciem mikrostimulatora weryfikowaliśmy prąd generowany przez niego poprzez pomiar oscyloskopowy sygnału, a także przeprowadziliśmy zapisy elektrofizjologiczne nerwu błędnego na szyi po jednoczesnej stymulacji podprzeponowej tego samego nerwu. Uzyskane wyniki wskazywały na skuteczność generowania pobudzenia aferentnego w nerwie błędnym przez mikrostimulator. Chcieliśmy jednak także zweryfikować skuteczność VNS po zakończeniu całego eksperymentu, dlatego poszukiwaliśmy specyficznych, morfologicznych markerów aktywacji neuronalnej.

Zidentyfikowano kilka markerów aktywności metabolicznej neuronów, między innymi białka c-Fos oraz c-Jun. Poziom tych białek, będących produktem genów c-fos i c-jun, należących to tzw. „immediate early genes”, wzrasta znacząco po działaniu bodźców o różnym charakterze i uczestniczą one w regulacji ekspresji peptydów oraz neurotransmiterów w komórkach układu nerwowego. Wzrost ekspresji białka c-Fos jest obecnie powszechnie akceptowanym markerem morfologicznym aktywności neuronalnej.

Zwój guzowaty nerwu błędnego szczura zawiera około 6000 neuronów (VAN – vagal afferent neurons) o wielkości od 15 to 50  $\mu\text{m}$ . Neurony te zbierają informacje z narządów jamy brzusznej, jak również klatki piersiowej, a ich wypustki centralne kończą się w *nucleus tractus solitarii* oraz *area postrema*. Dlatego w celu oceny skuteczności VNS postanowiliśmy

zbadać ekspresję c-Fos w neuronach zwojów guzowatych nerwu błędnego u szczurów poddanych elektrostymulacji.

Dorosłym samcom szczepu Wistar (n = 24), żywionych dietą bogatą w tłuszcze wszczepiono mikrostimulatory wg uprzednio opisanej metody, a następnie lewy nerw błędny stymulowano podprzeponowo (impuls 10 ms, amplituda 200 mV, częstotliwość 0.05 Hz).

Eksperyment objął dwie grupy zwierząt - stymulowanych przez 3 tygodnie (n=12) oraz przez 3 miesiące (n=12), przy czym w każdej grupie wyróżniono podgrupę stymulowaną oraz kontrolną – odpowiednio po 6 zwierząt). Po zakończeniu stymulacji pobieraliśmy prawe i lewe zwoje guzowate nerwów błędnych, utrwalaliśmy w formalinie i zatapialiśmy w bloczkach parafinowych. Następnie w uzyskanych preparatach zwojów guzowatych metodami immunohistochemicznymi identyfikowaliśmy neurony (znakując je przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku PGP 9.5 - markerowi komórek nerwowych), a następnie uwidacznialiśmy komórki c-Fos pozytywne – „aktywowane” neurony.

Analiza mikroskopowa wykazała znaczący wzrost odsetka neuronów c-Fos pozytywnych w lewym zwoju guzowatym, zarówno po 3 tygodniach, jak również po 3 miesiącach stymulacji w odniesieniu do grupy kontrolnej. Czas stymulacji nie wpływał na odsetek komórek c-Fos pozytywnych – nie zaobserwowaliśmy różnic pomiędzy zwojami poddanymi 3 tygodniowej VNS w stosunku do 3 miesięcznej VNS. Co ciekawe, zauważyliśmy również niewielki, chociaż nieznamienisty wzrost odsetka komórek c-Fos pozytywnych w prawych zwojach nerwów błędnych w obu eksperymentach.

Zwiększona liczba neuronów wykazujących ekspresję białka c-Fos w lewym zwoju guzowatym nerwu błędnego zarówno w trakcie, jak również po zakończeniu eksperymentu, potwierdziła aferentny charakter transmisji sygnałów (generowanych przez mikrostimulator) przewodzonych przez nerwy błędne z obwodu do ośrodków mózgowych, dowodząc skuteczności zastosowanej metody VNS (27).

Opracowanie powtarzalnej metody wizualizacji komórek nerwowych wykazujących ekspresję białka c-Fos nie było łatwe i zajęło nam sporo czasu. Natomiast pozwoliło uwidocznić aktywowane neurony nie tylko w zwojach guzowatych nerwu błędnego, ale także w jądrze pasma samotnego (NTS) oraz jądrze łukowatym podwzgórza (ARH), co wykorzystywaliśmy w dalszych badaniach.

**4. Gil K, Bugajski A, Thor P: Electrical vagus nerve stimulation decreases food consumption and weight gain in rats fed high-fat diet. *J Physiol Pharmacol.* 2011, 62; 637-646**

Stosowane uprzednio mikrostimulatory posiadały pewne ograniczenia. Po pierwsze ich przygotowanie wymagało każdorazowego programowania układu elektronicznego. Tak

przygotowany mikrostimulator generował impulsy o ustalonych parametrach przez 24 godziny na dobę i szczury otrzymywały „sygnały sytości” przez całą dobę. Natomiast charakter odżywiania szczurów (szczury spożywają ponad 80% pokarmu w nocy) powodował, że wskazane byłoby ich stymulowanie tylko w godzinach nocnych, w porze żerowania. Ponadto zaprogramowane układy elektroniczne wymagały stałego zasilania bateryjnego, co zwiększało ich wymiary (istotne przy wszczepieniu), a także limitowało czas ich pracy do momentu wyczerpania baterii (dość trudny do precyzyjnego określenia). Dlatego w kolejnych eksperymentach użyliśmy mikrostimulatorów zasilanych zewnętrznym polem magnetycznym (wykonanych również w Instytucie Technologii Elektronowej w Krakowie). Dzięki tej technologii mogliśmy stymulować zwierzęta od godzin wieczornych do rannych (standardowo od 18 do 6 rano - „dark phase stimulation”), a poza tym dowolnie ustalać żądane parametry stymulacji. Zwiększyliśmy także częstość stymulacji do 10 Hz, okres stymulacji wynosił 42 dni, natomiast pozostałe parametry - czas impulsu 10 ms, amplituda 200 mV nie uległy zmianie.

Przewlekła stymulacja lewego nerwu błędnego znamienne zmniejszała przyjmowanie pokarmu, przyrost wagi ciała oraz zawartość najądrzowej tkanki tłuszczowej w grupie poddanej VNS w odniesieniu do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowaliśmy znaczne pobudzenie neuronów w jądrze pasma samotnego nerwu błędnego po stymulacji (ocenianej poprzez ekspresję białka c-Fos), co potwierdziło skuteczność i aferentny charakter VNS. Stwierdziliśmy także zmiany poziomu peptydów uczestniczących w regulacji przyjmowania pokarmu: spadek poziomu leptyny korelujący ze spadkiem masy ciała, wzrost poziomu greliny oraz wzrost poziomu nesfatyny-1, niedawno odkrytego peptydu o silnym działaniu anoreksygenym w grupie zwierząt poddanych elektrostymulacji.

Uzyskane wyniki wsparły naszą hipotezę, że stymulacja nerwu błędnego prowadzi do redukcji przyjmowania pokarmu, hamowania przyrostu masy ciała oraz zmniejszenia tkanki tłuszczowej poprzez zwiększenie dośrodkowej impulsacji aferentnej przewodzonej przez nerwy błędne. Wykazały także, że zastosowany model elektrostymulacji w godzinach nocnych przy zastosowaniu nowego typu mikrostimulatorów jest skuteczny (29).

*5. Krzysztof Gil, Andrzej Bugajski, Magdalena Kurnik, Piotr Thor: Chronic vagus nerve stimulation reduces body fat, blood cholesterol and triglyceride levels in rats fed a high-fat diet. Folia Medica Cracoviensia 2012, LII (52), 3-4: 79-96*

Ponieważ zastosowana w poprzednich badaniach przewlekła elektrostymulacja nerwu błędnego prowadziła między innymi do zmniejszonego gromadzenia tkanki tłuszczowej, w



kolejnej serii badań postanowiliśmy sprawdzić, czy i jak VNS wpływa na procesy metaboliczne w zakresie gospodarki lipidowej. Poddaliśmy szczury stymulacji wg protokołu zastosowanego poprzednio (42 dni, „dark phase stimulation”, amplituda 200 mV, czas pojedynczego impulsu 10ms), natomiast zmniejszyliśmy częstotliwość stymulacji do 1 Hz. Okazało się, że także VNS o częstotliwości 1 Hz powodował spadek ilości spożywanego pokarmu, ograniczenie przyrostu masy ciała oraz zmniejszenie masy FAT-padów. Zmiany te były jednak nieco mniej nasilone, niż w przypadku poprzednich eksperymentów, gdy częstota stymulacji wynosiła 10 Hz. Nie było to zaskakujące, a nawet potwierdziło nasze wcześniejsze założenia, ponieważ zaczęły się pojawiać doniesienia, że częstota stymulacji nerwu błędnego ma wpływ na charakter uzyskiwanych efektów: VNS o wysokiej częstotliwości (10–30 Hz) powinna działać hipotetycznie bardziej na włókna aferentne, natomiast VNS o częstotliwości niższej niż 5 Hz miała za zadanie aktywować także włókna eferentne. Natomiast badając krew zwierząt zauważyliśmy, że przewlekła stymulacja lewego nerwu błędnego znamienne obniżała poziom całkowitego cholesterolu oraz trójglicerydów; z kolei poziom glukozy, frakcji HDL cholesterolu oraz transaminaz wątrobowych nie ulegał zmianie, a poziom cholesterolu frakcji LDL był obniżony, chociaż bez znamienności statystycznej. Wyniki oznaczeń greliny i leptyny były podobne do uzyskanych we wcześniejszych badaniach, ale znowu naszą uwagę zwrócił podwyższony poziom nesyfatyny-1 w grupie zwierząt poddanych VNS.

Eksperyment ten wykazał, że oprócz wpływu na przyjmowanie pokarmu, normalizację masy ciała oraz gromadzenie tkanki tłuszczowej, przewlekła obwodowa elektrostymulacja nerwu błędnego może poprawiać parametry gospodarki lipidowej u zwierząt żywionych dietą wysokotłuszczową, oraz że nesyfatyna-1 wydaje się być istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za te zmiany (35). Otwiera to pole do dalszych badań, a nawet stwarza potencjalne możliwości terapeutyczne.

*6. Krzysztof Gil, Andrzej Bugajski, Magdalena Kurnik, Piotr Thor: Electrical chronic vagus nerve stimulation activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats fed high-fat diet. Neuroendocrinol Lett 2013; 34(4):314–321*

Mózg i przewód pokarmowy komunikują się ze sobą dwukierunkowo, poprzez tzw. oś mózgowo – jelitową, dla której podstawę anatomiczną stanowi autonomiczny układ nerwowy, a w zasadniczej części nerw błędny. Nerw błędny bierze udział w regulacji homeostazy ustrojowej, wpływając na reakcje neuro - endokrynno – immunologiczne. Czynniki stresowe, drogą włókien aferentnych nerwu błędnego aktywują neurony jądra przykomorowego

podwzgórza, prowadząc do uwalniania CRH (corticotropin releasing hormone). CRH drogą przysadkowego krążenia wrotnego stymuluje komórki kortykotropowe przedniego płata przysadki, uwalniając, między innymi, hormon adrenokortykotropowy (ACTH). ACTH działając na korę nadnerczy prowadzi do sekrecji glikokortykoidów - kortyzolu u ludzi, natomiast kortykosteronu u szczurów. Glikokortykoidy, będąc ostatecznym efektem osi podwórze – przysadka - nadnercza odrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy ustroju oraz reakcji organizmu na stres.

Ponieważ VNS działa centralnie aktywując neurony aferentne w zwojach guzowatych nerwu błędnego, a następnie ośrodki w mózgu (NTS), zadaliśmy sobie pytanie, czy pobudzenie NTS spowodowane przez stymulację nerwu błędnego może wpływać na aktywność osi podwórze – przysadka - nadnercza.

W tym celu dorosłe szczury Wistar żywione dietą odpowiednio wysokotłuszczową lub standardową poddaliśmy elektrostymulacji lewego nerwu błędnego wg przyjętego wcześniej schematu (42 dni, „dark phase stimulation”, częstość stymulacji odpowiednio: 1Hz lub 10Hz), monitorowaliśmy ich parametry (dzienne przyrosty wagi, ilość spożywanego pokarmu), a po dekapitacji na zakończenie eksperymentu pobraliśmy FAT-pady, aby ocenić zawartość trzewnej tkanki tłuszczowej oraz krew do oznaczenia poziomu kortykosteronu metodą ELISA. W celu weryfikacji skuteczności VNS ocenialiśmy liczbę aktywowanych komórek nerwowych (c-Fos pozytywnych) w jądrze pasma samotnego nerwu błędnego (NTS).

VNS znacząco podnosiła poziom kortykosteronu we krwi zwierząt, przy czym silniejszy efekt wywoływała stymulacja impulsami o wyższej częstotliwości (10Hz), niż o niższej (1Hz). Sama dieta wysokotłuszczowa nie wpływała na poziom kortykosteronu we krwi zwierząt badanych. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach, VNS powodowała spadek wagi ciała, ilości spożywanego pokarmu oraz zawartości tkanki tłuszczowej. Ponadto stymulacja lewego nerwu błędnego spowodowała znaczący wzrost liczby neuronów c-Fos pozytywnych w NTS, świadcząc o skuteczności zastosowanej metody VNS w modulacji ośrodków centralnych. Uzyskane wyniki badań wskazują, że przewlekła stymulacja nerwu błędnego, oprócz bezpośredniego wpływu na mechanizmy przyjmowania pokarmu, może prowadzić do aktywacji osi podwórze – przysadka - nadnercza.

Obserwacje uzyskane w tych ostatnich doświadczeniach otwierają nowe możliwości badawcze. Od kilku już bowiem lat postuluje się udział czynników zapalnych w powstawaniu otyłości indukowanej nadmiernym w stosunku do zapotrzebowania spożywaniem pokarmu lub energii i następczym pobudzeniem do proliferacji/hipertrofii komórek tkanki tłuszczowej - adipocytów. Proces ten, określany nazwą zapalenia metabolicznego (*metaflammation*) obejmuje dyskretne, ale przewlekłe zmiany zapalne o niskim stopniu nasilenia, obejmujące

nie tylko tkankę tłuszczową, ale także wątrobę, mięśnie oraz komórki mózgu. Procesy te, mediowane przez cytokiny, jak również regulowane przez czynniki nerwowe, mogą się przyczyniać do rozwoju insulinooporności i nietolerancji glukozy oraz innych zaburzeń metabolicznych, w tym także obejmujących gospodarkę tłuszczową.

Skoro przewlekła obwodowa stymulacja nerwu błędnego wpływa bezpośrednio na główny element odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy ustrojowej (oś podwzgórze – przysadka - nadnercza), to aktywacja jej oraz następowy wzrost uwalniania glikokortykoidów przez korę nadnerczy może działać przeciwzapalnie i stanowić jeden z mechanizmów pozytywnego działania VNS o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym w otyłości lub zaburzeniach lipidowych prowadzących do powstania miażdżycy (36).

### **Podsumowanie:**

Przedstawione w powyższych publikacjach badania wykazały, że przewlekła obwodowa elektrostymulacja nerwu błędnego wywiera korzystny wpływ w zakresie regulacji przyjmowania pokarmu, wagi ciała oraz metabolizmu lipidowego. Zaletami zastosowanego modelu badawczego są długotrwałe obserwacje, przeprowadzenie eksperymentów na dorosłych zwierzętach odżywianych dietą bogatą w tłuszcze oraz możliwość prowadzenia stymulacji w godzinach nocnych wg zadanych parametrów. Opracowany schemat eksperymentalny umożliwia badanie wpływu VNS także w innych modelach chorobowych. Pierwsze próby zastosowania VNS u ludzi w terapii otyłości (prowadzone w renomowanych światowych ośrodkach) nie przyniosły dotychczas oczekiwanych rezultatów. Wynika to przede wszystkim z wciąż ograniczonej wiedzy na temat mechanizmów działania elektrostymulacji nerwu błędnego, a nieliczne opublikowane doniesienia pochodzą właśnie z badań prowadzonych na modelach zwierzęcych, w znacznej części zresztą z naszego ośrodka. Dlatego istotnym odkryciem wydaje się być stwierdzenie podwyższonego wskutek stymulacji poziomu nesfatyny-1, peptydu o silnym działaniu anoreksygennym, co może częściowo wyjaśniać mechanizm działania VNS. Z kolei aktywacja osi podwzgórze – przysadka – nadnercza pod wpływem VNS może działać przeciwzapalnie, a ponadto wpływać na homeostazę ustrojową, stanowiąc punkt wyjścia do potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Prowadzone obecnie przez nas kolejne badania (jeszcze nie opublikowane) wskazują, że VNS może mieć znaczenie w hamowaniu rozwoju zmian tłuszczeniowych w wątrobie, a nawet wczesnych zmian miażdżycowych w aorcie u szczurów odżywianych dietą wysokotłuszczową, i że biorą w tym udział neurony ośrodków regulacyjnych podwzgórze. Wydaje się, że neuromodulacja nerwu błędnego w przyszłości może stać się jedną z alternatywnych metod w terapii otyłości.

#### 4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych:

Już podczas studiów współuczestniczyłem w projektach badawczych poświęconych zagadnieniom patofizjologii układu oddechowego realizowanych w Katedrze Patofizjologii w ramach Studenckiego Koła Naukowego. Następnie, już jako asystent, kontynuowałem badania naukowe w tej dziedzinie, szczególnie koncentrując się na ocenie komórek przestrzeni oskrzelowo – pęcherzykowej uzyskanych metodą płukania oskrzelowo – pęcherzykowego (bronchoalveolar lavage – BAL) pobranych od pacjentów z chorobami śródmiąższowymi płuc. Szczególnie zainteresowały mnie zmiany występujące w płucach u ludzi narażonych na działanie pyłów azbestu i krzemu. W ramach realizowanego projektu badawczego KBN przeprowadziliśmy ocenę populacji komórek płuc poddanych działaniu pyłów nieorganicznych (azbestowych i krzemowych) u ponad 200 osób. Zastosowaliśmy nowoczesne metody badawcze, między innymi komputerową analizę obrazu do oceny uzyskanych obrazów cytologicznych i pomiarów komórek BAL oraz metody immunohistochemiczne. Ocenialiśmy żywotność, liczbę oraz skład odsetkowy komórek napływowych BAL, markery immunologiczne aktywności limfocytów i makrofagów oraz indeks fagocytarny makrofagów pęcherzykowych. W przypadkach ekspozycji na pyły krzemionki i azbestu zaobserwowaliśmy znaczący napływ komórek zapalnych, głównie makrofagów pęcherzykowych (*alveolitis macrophagica*), neutrofilów oraz eozynofiliów i limfocytów, nasilenie procesu włóknienia miąższu płucnego oraz zmiany morfologiczne i cytopatyczne makrofagów pęcherzykowych, co pozwoliło na określenie typowego obrazu zmian w płucach po ekspozycji na pyły azbestu i krzemionki. Równolegle, w celu potwierdzenia uzyskanych wyników, prowadziłem badania nad komórkami przestrzeni oskrzelowo – pęcherzykowej, a zwłaszcza aktywnością makrofagów pęcherzykowych w opracowanym specjalnie modelu doświadczalnej pylicy krzemowej u szczurów.

Uzyskane rezultaty badań zostały przedstawione przez mnie w pracy doktorskiej pt. *Cytoimmunologiczna charakterystyka zmian w płucach wywołanych pyłami krzemu i azbestu* (promotor – prof. dr hab. med. Zbigniew Chłap), obronionej na Wydziale Lekarskim CM UJ w dniu 18 maja 2001 roku, a następnie opublikowane (17, 18, 21). Po uzyskaniu stopnia doktora nadal zajmowałem się badaniem odczynów komórkowych w przestrzeni oskrzelowo – pęcherzykowej płuc w wybranych chorobach śródmiąższowych (22), między innymi u chorych z sarkoidozą, twardziną układową (7), pylicami płuc (8), oraz w grupie dzieci z astmą oskrzelową (5, 14). Podsumowaniem tego okresu mojej aktywności naukowej był współdziałanie w przygotowaniu atlasu multimedialnego cytologii płukania oskrzelowo – pęcherzykowego, wydanego przez Medycynę Praktyczną, którym znalazły się obrazy

wybrane ze zbioru obejmującego prawie 10000 preparatów oraz podrozdziały poświęcone technice pobierania i przygotowania materiału oraz nowym metodom badawczym: komputerowej analizie obrazu, cytometrii przepływowej, czy technice badania BAL u dzieci (54).

Wykorzystując zdobyte doświadczenie w zakresie technik mikroskopowych oraz znajomość metod analizy obrazu (co stało się możliwe dzięki dostępności komputerów o większej mocy obliczeniowej) w tym samym czasie rozpocząłem badania nad wykorzystaniem metod morfometrycznych we wspomaganiu diagnostyki histopatologicznej nowotworów, szczególnie krtani, oskrzeli, jelita grubego i tarczycy. W zweryfikowanych histologicznie wycinkach tkanek nowotworowych mierzyliśmy liczne parametry kariometryczne i cytometryczne (osie długie i krótkie jądra i komórki, wskaźnik okrągłości i stopień wydłużenia, gęstość optyczną, pola, obwody, stopień rozproszenia oraz inne parametry morfometryczne), a następnie w współpracy ze statystykami analizowaliśmy uzyskane pliki wynikowe. Wykazaliśmy, że analiza parametryczna komórek tych nowotworów może poprawiać czułość i swoistość ich rozpoznawania histopatologicznego (3). Szczególnie przydatne jest to wtedy, gdy metody morfometryczne wspomagają inne dodatkowe techniki diagnostyczne, np. pomiar gęstości naczyniowej nowotworów (angiogeneza guza) (9), czy ocena tzw. organizatorów jąderkowych NOR (NOR ang. nucleolus organizer region) (1, 2). W oparciu o zgromadzone dane, we współpracy z Katedrą Automatyki Akademii Górniczo – Hutniczej w Krakowie podjęliśmy próbę zastosowania metody sieci neuronalnych, stworzonej w oparciu o parametry morfometryczne tworzące tzw. „zbiór uczący” do wspomagania procesu diagnostycznego (10, 53). Ponadto wykazaliśmy, że wyniki analizy pomiarów morfometrycznych mogą mieć także znaczenie rokownicze w przypadku przewidywania przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych (6, 10, 37), a nawet przebiegu klinicznego choroby nowotworowej (4, 13).

Dalsze badania naukowe, poświęcone motoryce przewodu pokarmowego u szczurów, prowadziłem w ramach stypendium (research fellowship) w Houston Medical School – Department of Integrative Biology and Pharmacology w latach 2002-2003, pod kierunkiem prof. N.Weisbrodta i prof. G.C.Rosenfelda. Badania tam prowadzone dotyczyły wpływu antagonistów i agonistów receptorów opioidowych na mechanizmy obwodowej i centralnej regulacji motoryki przewodu pokarmowego w warunkach rozwijającej się zależności od opioidów (20). Pobyt w tym renomowanym ośrodku umożliwił mi poznanie nowoczesnych metod badawczych, jak podawanie dokomorowe leków, badania pasażu jelitowego oraz zapisów aktywności motorycznej przewodu pokarmowego u szczurów. Ponadto zapoznałem

się z nowoczesnymi technikami laboratoryjnymi oraz technikami zabiegowymi u drobnych zwierząt laboratoryjnych.

Opanowanie metody immunoenzymatycznego znakowania markerów komórkowych umożliwiło mi rozpoczęcie dużego cyklu badań nad rozmieszczeniem komórek śródmiąższowych Cajala w przewodzie pokarmowym u ludzi oraz zwierząt.

Komórki Cajala (Interstitial Cells of Cajal - ICC) są komórkami rozrusznikowymi dla mięśniówki gładkiej przewodu pokarmowego oraz stanowią połączenie pomiędzy tą mięśniówką i zakończeniami autonomicznego układu nerwowego. Choć odkryto je ponad 100 lat temu (Cajal, 1893), to dopiero od kilkunastu lat powiązano ich występowanie z zaburzeniami aktywności motorycznej przewodu pokarmowego. ICC zlokalizowane są głównie w błonie mięśniowej pomiędzy warstwą okrężną i podłużną mięśniówki. Ostatnie doniesienia wskazują, że ICC mogą mieć także nieco inną lokalizację i że jest ona ściśle powiązana z funkcją tych komórek (w związku z czym wyróżnia się kilka grup ICC zlokalizowanych w przewodzie pokarmowym). Dotychczasowe publikacje pozwoliły stwierdzić, że nie wszystkie ICC pełnią jednakową rolę w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego, dlatego istotne jest położenie i rodzaj ICC w omawianiu rozwoju, funkcji i plastyczności tych komórek. Podstawowe funkcje ICC to powstawanie pobudzeń elektrycznych (komórki rozrusznikowe), przewodzenie fal wolnych i organizacja skurczów fazowych w przewodzie pokarmowego. Niektóre klasy ICC tworzą połączenia z neuronami jelitowymi i przekazują impulsy nerwowe przez system białek receptorowych o określonej ekspresji i system wtórnych przekaźników lub kanałów jonowych. Utrata tych komórek powoduje obniżenie kontroli nerwowej motoryki przewodu pokarmowego i zaburzenie jego prawidłowej funkcji. Uwidocznienie tych komórek w preparatach mikroskopowych naraża wiele trudności, podobnie jak brak wartości referencyjnych, ale zastosowanie metody podwójnej i potrójnej immunofluorescencji pozwoliło nam zlokalizować ICC (11). W badaniach przeprowadzonych wraz z Kolegami z III Katedry Chirurgii Collegium Medicum UJ, wykazaliśmy, że w zmniejszenie liczby komórek Cajala w błonie mięśniowej jelita odgrywa istotną rolę w patogenezie uchyłkowatości jelita grubego (12, 46). Z kolei w badaniach eksperymentalnych zaobserwowaliśmy, że zarówno silna stymulacja elektryczna (15), jak również działanie zewnętrznego pola magnetycznego może uszkadzać ICC (16), i że odbywa się to najprawdopodobniej w mechanizmie apoptozy (19). Stwierdziliśmy także uszkodzenie komórek Cajala w eksperymentalnym modelu zapalnym pęcherza moczowego (26), a także po podaniu dootrzewnowym salsolinolu (23, 40).

W ostatnim czasie opisano komórki o fenotypie odpowiadającym komórkom śródmiąższowym Cajala zlokalizowane śródmięśniowo poza przewodem pokarmowym

Komórki te są obecnie przedmiotem intensywnych badań i określane są przez niektórych autorów mianem „telocytów” lub „komórek typu Cajala”.

W wyniku badania realizowanego przy współudziale kilku Katedr Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie dokonaliśmy jako pierwsi w Polsce identyfikacji komórek typu Cajala w ścianie pęcherzyka żółciowego człowieka z użyciem nowoczesnych metod immunohistochemicznych. Dużą wartość poznawczą prac mają wyniki analizy ilościowej komórek typu Cajala w grupie chorych z kamicą pęcherzyka żółciowego, co potwierdza kluczową ich rolę w spadku kurczliwości pęcherzyka w kamicy oraz wykazanie, że liczba komórek typu Cajala negatywnie koreluje z indeksem litogenności żółci, natomiast kwasy żółciowe mogą pełnić rolę uszkodzającą lub protekcyjną w zależności od ich właściwości hydrofilowych bądź hydrofobowych (30 - 33).

Wyniki badań przedstawione w powyższym cyklu 4 publikacji uzyskane podczas realizacji projektu posiadają istotne znaczenie praktyczne w dziedzinie anatomii, histologii, chirurgii i gastroenterologii i mogą przyczynić się do rozwoju nowych metod leczenia zaburzeń motoryki pęcherzyka żółciowego, stojących u podłoża kamicy. Potwierdzeniem wysokiej wartości naukowej publikacji naszego zespołu jest artykuł opublikowany w sekcji Research Highlights czasopisma Nature Reviews of Gastroenterology and Hepatology (*Franks I. Gallbladder: Loss of interstitial Cajal-like cells in the gallbladder might contribute to gallstone formation. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012; 9(12):689. doi: 10.1038/nrgastro.2012.224*), w którym autorka zaprezentowała wyniki naszych.

Kontynuując badania na komórkami typu Cajala obecnie koncentrujemy się nad analizą zaburzeń ilościowych i jakościowych komórek typu Cajala w drogach moczowych w grupie dzieci z wrodzonym i nabytym wodonerczem w ramach współpracy z Kliniką Urologii Dziecięcej Polsko – Amerykańskiego Instytut Pediatrii Wydziału Lekarskiego CM UJ.

Kolejnym realizowanym tematem badawczym są zmiany trzewnego układu nerwowego poddanej ekspozycji na neurotoksyny. W chorobie Parkinsona, poza zmianami w układzie pozapiramidowym centralnego układu nerwowego, występują również zmiany neurodegeneracyjne w trzewnym układzie nerwowym. Postuluje się, że zmiany w przewodzie pokarmowym mogą wyprzedzać wystąpienie bardziej charakterystycznych objawów neurologicznych nawet o kilka lat. Wykazano, że wybrane toksyny dostające się do organizmu drogą jelitową (np. tetrahydroizochinoliny) mogą lokalnie zapoczątkowywać procesy neurodegeneracyjne, rozprzestrzeniające się ośrodkowo i prowadzić do rozwoju choroby Parkinsona. Ze względu na regulacyjną funkcję neuronów trzewnych nawet niewielkie ich uszkodzenie może przełożyć się na znaczące zaburzenia perystaltyki, wydzielania oraz absorpcji płynów i substancji odżywczych. Dlatego tematem prowadzonych

badania była ocena wpływu salsolinolu (1-metylo- 1,2,3,4-tetrahydroizochinolino-6,7-diol), podawanego przewlekle u szczurów na procesy zachodzące w trzewnym układzie nerwowym. Salsolinol podawano dootrzewnowo poprzez mini-pompy osmotyczne, pobrane fragmenty jelita preparowano przy pomocy metody LMMP (longitudinal muscle-myenteric plexus preparation) i wybarwiano immunofluorescencyjnie stosując przeciwciała przeciwko wybranym markerom komórkowym. Salsolinol wpływał istotnie uszkadzająco na komórki splotu Auerbacha (spadek powierzchni ciała neuronu, liczby neuronów w zwojach, powierzchni zwojów, grubości włókien pierwszorzędowych); powodował również spadek liczby neuronów nitregicznych, podczas gdy liczba neuronów cholinergicznym nie ulegała zmianie. Uszkodzeniu ulegały także komórki Cajala. Wśród neuronów splotu trzewnego u szczurów poddanych działaniu salsolinolu zaobserwowano komórki wykazujące zwiększoną ekspresję białka proapoptotycznego Bax oraz depozyty  $\alpha$ -synukleiny. Salsolinol powodował spadek masy ciała zwierząt, nieznacznie hamował opróżnianie żołądkowe oraz perystaltykę jelita grubego (28, 34).

Uzyskane wyniki wskazują, że salsolinol wywiera neurotoksyczny wpływ na komórki jelitowych splotów Auerbacha, a w szczególności na neurony hamujące (NOS- pozytywne) trzewnego układu nerwowego, aktywując mechanizmy prowadzące do apoptozy. Spadek liczby neuronów nitregicznych może być odpowiedzialny za zaburzoną perystaltykę przewodu pokarmowego. Zastosowany w niniejszej pracy model zwierzęcy może posłużyć do badania patomechanizmów zaburzeń w przewodzie pokarmowym obserwowanych w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych i dlatego te badania nadal są prowadzone.

W ostatnich latach moja działalność naukowa skupiła się głównie wokół badań na rolę nerwu błędnego w regulacji apetytu. W ramach obszernych badań nad dekodowaniem i modulacją nerwu błędnego prowadzonych w Katedrze Patofizjologii skoncentrowałem się na zbadaniu wpływem stymulacji błędnej na przyjmowanie pokarmu. Wybrane prace z powstałych podczas realizacji tych badań publikacji stanowią podstawę prezentowanej przez mnie pracy habilitacyjnej.

Jestem autorem 54 publikacji oryginalnych i prac przeglądowych oraz 85 doniesień zjazdowych. Łączny wskaźnik impact factor wynosi:  $IF_{sum} = 38,272$ , Punkty KBN/MNiSW: 330,5; punkty IC: 262,36 (ISI Web of Science, wg stanu na dzień 02 lipca 2013), natomiast liczba cytowań: **98** (ISI Web of Science, 02.07.2013), 114 (SCOPUS, 06.07.2013), a wskaźnik Hirscha: **6** (ISI Web of Science, 02.07.2013), 7 (SCOPUS, 06.07.2013).



## 5. Działalność dydaktyczna.

Posiadam ponad 20-letnie doświadczenie w prowadzeniu zajęć dydaktycznych, najpierw jako asystent, następnie od 2002 roku jako adiunkt Katedry Patofizjologii, a obecnie starszy wykładowca. Uzyskanie specjalizacji w zakresie chorób wewnętrznych dodatkowo poszerzyło moje przygotowanie do nauczania patofizjologii. Prowadzę zajęcia (wykłady, seminaria oraz ćwiczenia) w Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego na Wydziale Lekarskim, w tym także na kierunku lekarsko – dentystycznym, Wydziale Farmacji wraz z Oddziałem Analityki Medycznej, Wydziale Ochrony Zdrowia (pielęgniarstwo, położnictwo, ratownictwo medyczne) zarówno na studiach dziennych, jak również wieczorowych. Prowadziłem również zajęcia z patofizjologii w języku angielskim w ramach Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców prowadzonej przez Wydział Lekarski Collegium Medicum UJ, a także wykłady w ramach Uniwersytetu III Wieku prowadzonego przez Uniwersytet Jagielloński. Opiekowałem się studentami prowadzącymi badania w ramach Koła naukowego działającego przy Katedrze Patofizjologii. W 2011 roku zostałem wyróżniony przez Studentów w ankietach pracowników dydaktycznych wśród nauczycieli studenckich na III roku.

Jestem współautorem dwóch wydań podręcznika patofizjologii dla studentów medycyny (pod redakcją prof. Piotra Thora, wydanych w 2007 oraz 2009 roku przez Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne VESALIUS) (47-51). W podręcznikach tych przygotowałem rozdziały poświęcone patofizjologii chorób układu oddechowego, obrzękom oraz patofizjologii wybranych objawów chorób układu krążenia i oddechowego. Ponadto byłem tłumaczem dwóch rozdziałów, poświęconych patofizjologii chorób układowych oraz patofizjologii układu oddechowego, w wydanym przez ELSEVIER URBAN&PARTNER w 2010 roku podręczniku akademickim Patofizjologia (red. Damjanov, redakcja polska Bręborowicz, Thor, Winnicka). Opracowałem sylabusy, pytania testowe, zestawy egzaminacyjne i programy zajęć z patofizjologii dla Studentów różnych kierunków, a obecnie biorę udział w przygotowywaniu nowych programów nauczania patofizjologii w związku z reformą zmieniającą standardy kształcenia studentów uczelni medycznych. Ponadto opracowuję materiały dydaktyczne do nauczania patofizjologii dla studentów różnych wydziałów CM UJ, także w postaci multimedialnej, które następnie są udostępniane na nowoczesnej platformie edukacyjnej PEGAZ.

Prowadziłem i obecnie prowadzę seminaria magisterskie (łącznie dla 9 osób) oraz pomagam w przygotowywaniu prac magisterskich (wyłącznie o charakterze badawczo –

eksperymentalnym) prowadzonych w Katedrze Patofizjologii dla Studentów Wydziałów Farmacji oraz Oddziału Analityki Medycznej. Ponadto recenzowałem 5 prac magisterskich.

Stworzyłem i prowadzę od wielu lat program zajęć fakultatywnych z zakresu diagnostyki chorób układu oddechowego pt. „*Metody diagnostyczne odczynów komórkowych w przestrzeni oskrzelowo – pęcherzykowej płuc*” dla Studentów Oddziału Analityki Medycznej w oparciu o metody komputerowej analizy mikroskopowego oraz technik immunocytoologicznych. W bieżącym roku akademickim uruchomiłem kolejne stanowiska dydaktyczno – naukowe przeznaczone do ćwiczeń oraz badań wykorzystujących metodę mikroskopii fluorescencyjnej.

## **6. Działalność organizacyjna**

Moja obecna działalność organizacyjna obejmuje przygotowanie i realizację projektów badawczych, wdrażanie nowych technik laboratoryjnych oraz nadzór na Pracownią Histologii, Immunochemii oraz Komputerowej Analizy Obrazu w Katedrze Patofizjologii CM UJ. Szczególnym osiągnięciem było stworzenie od podstaw Pracowni Komputerowej Analizy w Katedrze Patofizjologii Collegium Medicum UJ.

Od czasu studiów brałem udział w organizacji zjazdów naukowych (m.in. Światowego Kongresu Polonii Medycznej) (52) oraz zaangażowałem się aktywnie w działalność Stowarzyszenia Lekarze Świata (obecnie Lekarze Nadziei). Zorganizowałem i poprowadziłem liczne misje z pomocą humanitarną dla ludności regionów ogarniętych konfliktami lub klęskami żywiołowymi, między innymi do byłej Jugosławii (Sarajewo, Belgrad), Czeczenii, Albanii, Kazachstanu i na Ukrainę. Uczestniczyłem również w tworzeniu Przychodni Lekarskiej dla Ludzi Bezdomnych oraz w pracach organizacyjnych na rzecz Apteki Darów Stowarzyszenia Lekarze Nadziei w Krakowie.

Jestem czynnym członkiem Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, Polskiego Towarzystwa Cytometrii oraz European Neurogastroenterology & Motility Society. Od 2011 roku pełnię również rolę Sekretarza Redakcji *Folia Medica Cracoviensia* – czasopisma wydawanego przez Komisję Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, biorąc czynny udział w recenzowaniu, kwalifikacji prac i przygotowaniu do druku. Recenzowałem także prace dla innych czasopism medycznych krajowych i zagranicznych.

Istotnym osiągnięciem organizacyjnym i zarazem naukowym w ostatnim czasie było współtworzenie oraz zorganizowanie pracy zespołów badawczych zajmujących się analizą rozmieszczenia i funkcji komórek rozrusznikowych Cajala w patogenezie kamicy dróg żółciowych (wraz z Katedrą Histologii, Katedrą Anatomii, Katedrą Patomorfologii, I Kliniką

Chirurgii Ogólnej i Zakładem Biochemii Klinicznej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Wydziału Lekarskiego CM UJ), patogenezie zaburzeń motoryki jelita grubego (wraz z III Kliniką Chirurgii i Katedrą Anatomii CM UJ) oraz w zespołach zaburzeń motoryki dróg moczowych u dzieci (wraz z Kliniką Urologii Dziecięcej Polsko-Amerykańskiego Instytutu Pediatrii Wydziału Lekarskiego oraz Katedrą Histologii Collegium Medicum UJ). Dzięki współpracy udało się przygotować wspólne publikacje w indeksowanych czasopismach, doniesienia zjazdowe i wnioski o finansowanie do Narodowego Centrum Nauki.



dr n. med. Krzysztof Gil

*Numery zamieszczonych w tekście cytacji podano wg załącznika nr 4: Spis opublikowanych prac naukowych.*