

Kraków, 10.04.2016 r.

## **Autoreferat**

1. Imię i Nazwisko.

**Grzegorz J. Lis**

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

Dyplom lekarza medycyny - Akademia Medyczna im. Mikołaja Kopernika w Krakowie, 1989

Doktor nauk medycznych - Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie, 2000 – rozprawa obroniona z wyróżnieniem

Tytuł rozprawy: „Morfologia i właściwości fizyczne płatków allogeniczných aortalnych zastawek serca” (promotor: prof. dr hab. med. Tadeusz Cichocki)

Specjalizacja w zakresie chorób wewnętrznych (I stopień) – Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Krakowie, 1994

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

1990 - 1991 - Zakład Histologii, Akademia Medyczna w Krakowie – asystent stażysta

1991 – 1996 – Klinika Nefrologii AM w Krakowie – lekarz (wolontariat)

1991 - 2003 - Katedra i Zakład Histologii AM w Krakowie / Collegium Medicum UJ – asystent

Od 1995 – Szkoła Medyczna dla Obcokrajowców Collegium Medicum UJ – wykładowca

1996 - 1999 Institut für Klinische Forschung DR MED LENHARD & PARTNER GmbH, Overath, Niemcy - monitorowanie III i IV fazy badań klinicznych leków

1997 - 2000 - Studia Doktoranckie - Collegium Medicum UJ

2003 - 2013 - Katedra i Zakład Histologii Collegium Medicum UJ – adiunkt

Od 2013 - Katedra i Zakład Histologii Collegium Medicum UJ – starszy wykładowca

4. 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.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,  
Jednotematyczny cykl publikacji:

**Badania wybranych czynników biorących udział w przebudowie i kalcyfikacyjnej degeneracji ludzkich aortalnych zastawek serca.**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. **Lis GJ**, Litwin JA, Kapelak B, Furgal-Borzych A, Gajda M, Cichocki T, Sadowski J. Development of mature lamellar bone with a hematopoietic compartment in an aortic valve homograft. *J Heart Valve Dis.* 2009;18:578-80. **IF - 1,033; MNiSW - 15**
2. **Lis GJ**, Jasek E, Gajda M, Litwin JA, Czubek U, Jasińska M, Kapelak B, Sadowski J. Participation of tenascin C in native and homograft aortic valve degeneration *Adv Clin Exp Med.* 2011;20:157-164. **IF - 0,176; MNiSW - 15**
3. **Lis GJ**, Czubek U, Jasek E, Dziedzic-Oleksy H, Kapelak B, Nessler J, Sadowski J, Litwin JA. Histopathological characteristics of bicuspid aortic valve neovascularization and its impact on calcific remodeling and stenosis severity. *Exp Clin Cardiol.* 2014;20:5206-5215. **MNiSW - 15**
4. **Lis GJ**, Czapla-Masztafiak J, Kwiatek WM, Gajda M, Jasek E, Jasinska M, Czubek U, Borchert M, Appel K, Nessler J, Sadowski J, Litwin JA. Distribution of selected elements in calcific human aortic valves studied by microscopy combined with SR- $\mu$ XRF: influence of lipids on progression of calcification. *Micron* 2014;**67**:141-148. **IF - 1,988; MNiSW - 30**
5. Czapla-Masztafiak J, **Lis GJ**, Gajda M, Jasek E, Czubek U, Bolechała F, Borca C, Kwiatek WM. Determination of oxidation state of iron in normal and pathologically altered human aortic valves. *Nucl Instrum Methods Phys Res B.* 2015;364:70-75. **IF - 1,124; MNiSW - 25**
6. **Lis GJ**, Czubek U, Jasinska M, Jasek E, Loboda A, Dulak J, Nessler J, Sadowski J, Litwin JA. Elevated serum osteoprotegerin is associated with decreased osteoclastic differentiation in stenotic aortic valves. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65:377-82. **IF - 2,386; MNiSW - 25**
7. **Lis GJ**, Czubek U, Jasek-Gajda E, Łoboda A, Dulak J, Nessler J, Kapelak B, Sadowski J, Litwin JA. Influence of osteoclasts and osteoprotegerin on the mode of calcific degeneration of aortic valves. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126:149-158. **IF - 2,121; MNiSW - 25**

Łączna punktacja cyklu: **IF – 8,828; MNiSW - 150**

- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

## **Wprowadzenie**

Degeneracja wapniowa zastawki aortalnej jest złożonym, przewlekłym procesem patologicznym prowadzącym do upośledzenia możliwości prawidłowego otwarcia zastawki warunkującego swobodny przepływ krwi do aorty podczas skurczu lewej komory. Progresa zwężenia zastawki (stenozy) prowadzi do konieczności wymiany zastawki, a próby farmakologicznego zahamowania czy też odwrócenia zmian w zastawkach jak dotąd nie są skuteczne. Szybko postępujący proces degeneracji wapniowej obserwuje się w przypadku zastawek o wrodzonej nieprawidłowej budowie (jak dwupłatkowe) jak również w przeszczepianych zastawkach homogennych czy ksenogennych, co stanowi ich istotną wadę w stosunku do zastawek sztucznych.

Pod względem patogenezy degeneracja zastawki aortalnej wykazuje wiele analogii do zmian miażdżycowych w naczyniach. Występuje uszkodzenie śródbłonna, akumulacja lipidów, proces zapalny i zmiany kalcyfikacyjne, których stopień rozwoju jest w zastawkach większy niż w przypadku zmian miażdżycowych. Uszkodzenie bariery śródbłonkowej ułatwia wnikanie do zrębu zastawki czynników krwiopochodnych i komórek zapalnych, których aktywność stopniowo uszkadza prawidłową histoarchitekturę płatków. Wczesnym przejawem patologii jest pojawienie się w zrębie płotka złogów lipidów i lipoprotein (LDL, Lp(a)) wraz z towarzyszącymi im apolipoproteinami (APO-B, APO(a), APO-E) świadczącymi o ich krwiopochodnym pochodzeniu. Oksydacyjna modyfikacja lipidów sprzyja procesom kalcyfikacji, a także indukuje w komórkach śródbłonna ekspresję cząsteczek adhezyjnych (VCAM-1, ICAM-1) i chemoatraktantów (MCP-1) ułatwiających przenikanie z krwi do zrębu zastawki komórek zwłaszcza pochodzenia monocytarnego.

Wczesnym zmianom lipidowym towarzyszy zatem obecność komórek nacieku zapalnego, które w zdrowych zastawkach nie występują lub są spotykane jedynie sporadycznie. Są to głównie makrofagi ale również limfocyty, mastocyty, plazmocyty czy komórki dendrytyczne. Nacieki zapalne o różnym nasileniu są praktycznie stałym elementem obecnym zarówno we wczesnych jak i bardziej zaawansowanych stadiach degeneracji zastawek. Komórki zapalne są źródłem licznych cytokin jak IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 indukujących produkcję metaloproteinaz macierzy zdolnych degradować wszystkie składniki zrębu zastawki (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9), katepsyn (S, K, V i G) i glikoprotein

biorących udział w procesach włóknienia (trombospondyna-2, tenascyna C). Wykazano również aktywację układu dopełniacza, a także ekspresję receptorów typu Toll-like (Toll-like receptor 2 i 4) których stymulacja może prowadzić do różnicowania się komórek zrębu zastawki (VIC – valvular interstitial cell) w kierunku osteoblastycznym (osteoblasticVIC – obVIC). Procesy te wywołują niszczenie i degradację zrębu zastawki, a z drugiej strony wzmożoną syntezę jego składników w wyniku działania czynników profibrotycznych (TGF $\beta$ ). Efektem tych przeciwstawnych procesów jest pogrubienie i dezorganizacja prawidłowej trójwarstwowej architektoniki płątka określana jako jego patologiczna przebudowa (remodeling). Zmianom tym często towarzyszy rozwój naczyń krwionośnych. W fizjologicznie nieunaczynionych płatkach pojawiają się przede wszystkim cienkościenne naczynia typu kapilar i w mniejszym zakresie naczynia o grubszej ścianie z warstwą komórek kurczliwych. Istotnym skutkiem rozwoju unaczynienia wydaje się być zwiększenie dostępności pogrubiałego zrębu zastawki dla krwiopochodnych komórek i czynników nasilających procesy degeneracji zastawki. Ponadto wykazano niski stopień szczelności tworzonych naczyń czego skutkiem mogą być pojawiające się w uszkodzonych zastawkach ogniska mikrokrwawień, a także aktywne procesy wykrzepiania.

Najbardziej spektakularnym zjawiskiem w przebiegu degeneracji zastawki jest jej kalcyfikacja. Dostrzegana makroskopowo jedynie w bardziej zaawansowanych fazach jest obecna praktycznie od samego początku rozwoju zmian i stanowi główny czynnik odpowiadający za usztywnienie płatków i hemodynamiczną progresję stenozy. Przyczyny i mechanizmy kalcyfikacji zastawki aortalnej są badane od ponad stu lat. Początkowo dominował pogląd, że kalcyfikacja (mineralizacja) tkanek, które fizjologicznie nie są zmineralizowane (kalcyfikacja ektopowa) jest prostym (biernym) fizykochemicznym procesem, konsekwencją lokalnego uszkodzenia tkanki i udostępnienia miejsc wiążących jony  $Ca^{2+}$  i  $PO_4^{-3}$ , które w płynach pozakomórkowych są obecne w stanie metastabilnym w stężeniu bliskim punktowi ich precypitacji. Gwarancją ich niewytrącania się z roztworu jest obecność w płynach ustrojowych białkowych inhibitorów kalcyfikacji, wśród których najistotniejszą rolę przypisuje się chelatorom jonów wapniowych, takim jak białko GLA macierzy (matrix GLA protein - MGP) czy fetuina A (fetuina-A/AHSG). Obniżenie poziomu inhibitorów skutkuje bierną precypitacją soli wapnia. Potwierdzeniem słuszności tej teorii jest fakt, że myszy z wyłączonym genem kodującym MGP rozwijają masywną kalcyfikację aorty. Podobnie w badaniach na modelu szczurzym, zablokowanie aktywności MGP prowadzi do rozwoju zmian kalcyfikacyjnych w naczyniach. Fizykochemiczne mikrouszkodzenia (defekty strukturalne) takich elementów zastawkowych jak włókna kolagenowe i sprężyste, a także obecne w zastawce proteoglikany,

---

lipidy czy też ciała apoptotyczne (fosfolipidy błon komórkowych) są dobrymi nukleatorami inicjującymi procesy mineralizacyjne.

Rozwój technik badawczych w ostatnich trzydziestu latach umożliwił prześledzenie procesów jakie towarzyszą kalcyfikacji na poziomie subkomórkowym, biochemicznym i pierwiastkowym, efektem czego jest dominujący obecnie pogląd, iż ekotopowa kalcyfikacja jest aktywnie regulowanym procesem, w który zaangażowany jest zespół wyspecjalizowanych komórek i produkowanych przez nie mediatorów. Współczesne badania udowodniły obecność w wapniejących zastawkach licznych glikoprotein macierzy i czynników związanych z regulacją biomineralizacji w trakcie fizjologicznej osteogenezy, takich jak osteopontyna, osteokalcyna, osteonektyna, sialoproteina-II, białka morfogenetyczne kości (BMP2, BMP4). Wykazano również ekspresję czynników transkrypcyjnych związanych z osteoblastogenezą (RUNX2/Cbfa1 i MSX2) i chondroblastogenezą (Sox9). Uważa się, że pojawienie się osteoblastycznego fenotypu komórki w zastawce jest kluczowe dla rozwoju kalcyfikacji i prowadzi do wytworzenia struktur kostnych w zastawce. Źródłem komórek osteoblastycznych mogą być obecne w zastawce komórki śródmięzszowe o fenotypie komórek progenitorowych (pVICs) i komórek osteoblastycznych (obVICs), jak też krążące komórki progenitorowe oraz komórki mezenchymatyczne powstałe w procesie transróżnicowania z komórek śródbłonkowych (endothelial-to-mezenchymal transition – EMT).

Drugim typem komórek zaangażowanych w proces patologicznej przebudowy zastawek są osteoklasty, komórki pochodzenia monocytarnego zdolne do dekalcyfikacji i resorpcji tkanki kostnej, uczestniczące w procesie jej ciągłej przebudowy. Badania wykazały obecność komórek wykazujących cechy fenotypowe osteoklastów w wapniejących zmianach naczyniowych i zastawkowych. W badaniach na modelu mysim stwierdzono także zdolność tych komórek do resorpcji depozytów wapniowych. Układem integrującym aktywność komórek osteoblastycznych i osteoklastycznych w przypadku fizjologicznego kostnienia jest układ OPG/RANK/RANKL (osteoprotegeryna, aktywator receptora jądrowego czynnika  $\kappa$ B i jego ligand). Stwierdzono, że interakcja RANK (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B) obecnego w błonie prekursorów osteoklastów z jego ligandem RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) obecnym w błonie i uwalnianym głównie przez komórki osteoblastyczne indukuje powstawanie osteoklastów. Co ciekawe, RANKL jest także produkowany przez aktywowane limfocyty T, co w pewien sposób integruje homeostazę tkanki kostnej z układem immunologicznym i procesami zapalnymi. Osteoprotegeryna (OPG) jest glikoproteiną wydzielaną przez osteoblasty, która ma silne powinowactwo do RANKL i blokuje jego możliwość wiązania się z RANK hamując tym samym tworzenie osteoklastów.

W ostatnich latach obecność elementów układu OPG/RANK/RANKL zidentyfikowano w zastawkach aortalnych. Wyniki badań wskazują również na związek poziomu OPG w surowicy pacjentów stenotycznych poddanych zabiegowi wymiany zastawki z parametrami remodelingu lewej komory i występowaniem niekorzystnych zdarzeń sercowych w długookresowym przebiegu pooperacyjnym. Wydaje się zatem, że układ OPG/RANK/RANKL związany zarówno z komórkami o kluczowym znaczeniu w procesach kościotworzenia i kalcyfikacji jak i komórkami zapalnymi może odgrywać istotną regulacyjną rolę w degeneracji zastawki. Należy przy tym zaznaczyć, że choć obecność związków typowych dla macierzy kostnej w degenerującej zastawce jest dość częsta, pojawienie się prawdziwej metaplastyki kostnej jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim, występującym u kilku do kilkunastu procent operowanych chorych. Zarówno mechanizm powstawania tego fenomenu jak i znaczenie dla przebiegu choroby nie są jasne.

Badania fizykochemiczne, w tym również prowadzone przeze mnie we wcześniejszych latach we współpracy z Instytutem Fizyki UJ wykazały, że dominującą formą minerału obecnego w złogach wapniowych w zastawkach natywnych jak i homo- czy ksenogennych jest hydroksyapatyt, minerał fosforanowo-wapniowy stanowiący również główny nieorganiczny składnik kości. Choć w jego strukturze dominuje wapń i fosfor, to w niewielkich ilościach występują również kationy Na, K, Pb, Sr, Ra, Cu, Mn, Fe oraz aniony węglanowe, cytrynianowe, mleczanowe czy fluorkowe. We wczesnych fazach rozwoju mineralizacji obok hydroksyapatytu występują również inne formy fosforanów wapnia, co wskazuje, że z postępowaniem choroby następuje nie tylko postęp terytorialny wapnienia, lecz również zachodzą procesy zmieniające fizykochemiczną i morfologiczną charakterystykę zwapnień.

Chociaż generalnie wzrost kalcyfikacji zarówno w zmianach zastawkowych jak i naczyniowych uważa się za czynnik niekorzystny wiążący się z progresją choroby i pogorszeniem rokowania, to jednak istnieją dane wskazujące, że nie wszystkie formy kalcyfikacji są jednakowo niekorzystne, a niektóre z nich mogą wręcz korzystnie wpływać na trwałość płata zastawki (co wykazałem we wcześniejszych badaniach dotyczących trwałości homografitów (Lis et al. *J Heart Valve Dis.* 2003;12:741-51)) czy stabilność blaszki miażdżycowej i zredukować częstość przejściowych ataków ischemicznych (Hunt et al. *Stroke.* 2002;33:1214-1219).

Wskazuje to na konieczność wnikliwszej analizy procesu degeneracji wapniowej zastawek z uwzględnieniem histopatologicznej niejednorodności zmian i związanych z tym potencjalnych różnic w znaczeniu poszczególnych typów zmian dla postępu stenozы.



Skłoniło mnie to do podjęcia tej tematyki badawczej i współpracy w tym zakresie z Katedrą i Kliniką Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii CMUJ kierowaną przez prof. Jerzego Sadowskiego i Katedrą i Kliniką Choroby Wieńcowej CMUJ kierowaną przez prof. Jadwigę Nessler. Badania były finansowane z uzyskanej przeze mnie dotacji statutowej CMUJ (projekty: K/ZDS/000987 i K/ZDS/003823). Współpraca z Oddziałem Zastosowań Fizyki i Badań Interdyscyplinarnych Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN w Krakowie kierowanym przez prof. Wojciecha M. Kwiatka i uzyskanie grantów badawczych z europejskich laboratoriów fizyki jądrowej umożliwiły mi prowadzenie oryginalnych badań łączących tradycyjne metody histologiczne z zaawansowanymi technikami fizycznymi: mikrofluorescencją promieniowania synchrotronowego, SRIXE (*synchrotron radiation-induced X-Ray emission*) – badania prowadzone w HASYLAB/DESY, Hamburg (Niemcy), spektroskopią w podczerwieni FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) – badania prowadzone w INFN Laboratori Nazionale di Frascati (Włochy) i metodą absorpcji rentgenowskiej XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) – badania prowadzone w Paul Scherrer Institut PSI Villigen (Szwajcaria).

Zagadnienia te stanowią temat prezentowanego cyklu publikacji i stanowią mój indywidualny wkład w rozwój nauki. Publikacje są przedstawiane zgodnie z kolejnością prowadzonych prac badawczych.

1. **Lis GJ**, Litwin JA, Kapelak B, Furgal-Borzych A, Gajda M, Cichocki T, Sadowski J. Development of mature lamellar bone with a hematopoietic compartment in an aortic valve homograft. *J Heart Valve Dis.* 2009;18:578-80.

Jest to przypuszczalnie jedyny w piśmiennictwie światowym opis przypadku wystąpienia pełnej metaplastyki kostnej w homografcie aortalnym. Praca została opublikowana w impaktowanym czasopiśmie, a fakt unikalności opisu został dostrzeżony w pracy analizującej przypadki występowania metaplastyki kostnej i chrzęstnej w różnych typach zastawek aortalnych podlegających degeneracji wapniowej (Torre et al. *Cardiovasc Pathol.* 2016;25:18-24.).

Przypadek dotyczył 27-letniego mężczyzny u którego sześć lat wcześniej dokonano zastąpienia natywnej (dwupłatkowej) zastawki aortalnej pobranym ze zwłok (mężczyzna lat 52) homografem aortalnym. W eksplantowanej zastawce stwierdzono obecność dwóch fragmentów dojrzałej kości w formie beleczek o grubości 40-100µm wykazujących budowę blaszkowatą (grubość 3,4–3,6µm) z widocznym w mikroskopie polaryzacyjnym

charakterystycznym naprzemiennym układem blaszek jasnych i ciemnych. W obrębie beleczek widoczne były jamki kostne z osteocytami połączone systemem kanalików kostnych. Przestrzenie między beleczkami wypełnione były tkanką szpikową z obecnym przedziałem hemopoetycznym bogatym w wyspy erytroblastyczne, komórki mielopoezy sąsiadujące z jednopęcherzykowymi adipocytami i komórki trombopoezy. W grubszych fragmentach kości widoczne były również koncentryczne układy blaszek wokół kanałów o średnicy 40-90µm mieszczących cienkościenne naczynie krwionośne, co przypominało systemy Haversa. Widoczne były również cechy przebudowy kości. Obszary degenerującej chrząstki, a także pasma kwasochłonnego osteoidu z powierzchniowo zlokalizowanymi komórkami osteoblastycznymi i osteoklastycznymi wskazywały na występowanie osyfikacji zarówno śródchrzęstnej jak i na podłożu mezenchymatycznym. Pochodzenie kości w badanym przypadku nie jest jasne. Młody wiek pacjenta, brak zmian kalcyfikacyjnych jego własnej (dwupłatkowej) zastawki aortalnej i starszy wiek dawcy może sugerować, że induktory kostnienia znajdowały się w zastawce już w momencie jej wszczepiania. Wyjątkowość opisanego przypadku i przedstawiona analiza piśmiennictwa dotyczącego występowania cech osyfikacji w homograftach wskazuje, że powstanie kości nie jest prostym następstwem i konsekwencją jej dystroficznej kalcyfikacji.

2. **Lis GJ**, Jasek E, Gajda M, Litwin JA, Czubek U, Jasińska M, Kapelak B, Sadowski J. Participation of tenascin C in native and homograft aortic valve degeneration *Adv Clin Exp Med*. 2011;20:157-164.

Opisany w poprzedniej pracy przypadek zwrócił moją uwagę na występowanie cech aktywnej przebudowy w homograftach aortalnych. W kolejnym badaniu porównałem pod tym względem homografty i zastawki natywne. Głównym punktem zainteresowania była tenascyna C (TnC) glikoproteina macierzy biorąca aktywny udział w m. in. w procesach morfogenezy układu naczyniowego i kostnego, a po zakończeniu rozwoju uczestnicząca w procesach zapalnych, regeneracyjnych i przebudowy tkanek. Jest modyfikatorem aktywności proliferacyjnej, migracyjnej oraz różnicowania i apoptozy komórek, a jej związek z degeneracją natywnych zastawek został dostrzeżony stosunkowo niedawno (Satta i wsp. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:96-101.). W badaniu porównywaliśmy ekspresję TnC w natywnych stenotycznych aortalnych zastawkach serca i degenerujących homograftach aortalnych na tle zmian w gęstości i rozmieszczeniu komórek uczestniczących w przebudowie zastawek. Stosowano rutynowe metody histologiczne, immunohistochemiczne (immunofluorescencja pośrednia) oraz



---

morfometryczne. Na skrawkach mrozeniowych znakowano TnC, aktywowane komórki śródmiąższowe -  $\alpha$ VIC ( $\alpha$ SMA), makrofagi (CD68) oraz śródbłonki (CD34, von Willebrand Factor, laminin). Określano całkowitą ilość komórek śródmiąższowych (VIC) oraz proporcję  $\alpha$ VIC do VIC.

Wykazano silną ekspresję TnC zarówno w natywnych stenotycznych jak i degenerujących homogennych zastawkach aortalnych, co w przypadku tych ostatnich było stwierdzone po raz pierwszy. Choć lokalizacja TnC w obu grupach zastawek była podobna (tzn. głównie w obrębie wapniejących zmian ogniskowych oraz w komórkach śródbłonkowych wyścielających naczynia obecne w sąsiedztwie zwapnień, a także odcinkowo wzdłuż powierzchni płatków w rejonie blaszki podstawnej), to jednak poziom ekspresji TnC był istotnie wyższy w zastawkach natywnych niż w homograftach. Ponadto w zastawkach natywnych stwierdzono istotnie większą gęstość komórek oraz tendencję do większej proporcji  $\alpha$ VIC w populacji komórek śródmiąższowych. W obu typach zastawek makrofagi lokalizowały się głównie w rejonie wapniejących zmian ogniskowych ale częściowo także w zrębie płatków. Na uwagę zasługuje fakt, że szczególną cechą homografitów były „nabłonkowate” układy makrofagów obserwowane odcinkowo wzdłuż powierzchni płatka. Ponadto w tej grupie występowało niemal całkowite zatarcie budowy warstwowej płatków, a także znaczne ubytki śródbłonka i nierównomierna gęstość komórek śródmiąższowych oraz obecność obszarów całkowicie bezkomórkowych. Z kolei cechą zastawek natywnych był rozwój naczyń krwionośnych w rejonach zwapnień oraz pod powierzchnią płatka, gdzie często przyjmowały one formę szerokich kanałów częściowo wyścielonych śródbłonkiem. W sąsiedztwie naczyń obserwowano komórki nacieku zapalnego.

Przedstawione wyniki wskazują, że w obu typach zastawek (natywne i homogenne) występują aktywne mechanizmy przebudowy z udziałem TnC, aktywowanych komórek śródmiąższowych i komórek zapalnych. W homograftach mechanizmy te są jednak ograniczone, co sugeruje istotniejszy udział procesów dystroficznej, biernej degeneracji w tym przypadku. Pogląd ten został ostatnio rozwinięty przez grupę patologów z Uniwersytetu Harvarda (*Torre et al. Cardiovasc Pathol. 2016;25:18-24.*).

3. **Lis GJ**, Czubek U, Jasek E, Dziedzic-Oleksy H, Kapelak B, Nessler J, Sadowski J, Litwin JA. Histopathological characteristics of bicuspid aortic valve neovascularization and its impact on calcific remodeling and stenosis severity. *Exp Clin Cardiol.* 2014;20:5206-5215.

W poprzednim badaniu wykazałem, że naczynia dostrzegane w degenerujących zastawkach mają najczęściej morfologię typowych kapilar, ale stosunkowo często pojawiają się w nich również cienkościenne przestrzenie naczyniowe o zdecydowanie szerszej średnicy. W kolejnej pracy postanowiłem zatem ocenić czy rozwój naczyń w zastawce oraz ich morfologia są powiązane z obrazem kalcyfikacji i progresją zmian degeneracyjnych oraz stopniem klinicznego zaawansowania stenozy.

Badaniom poddano 41 dwupłatkowych zastawek aortalnych pochodzących od pacjentów operowanych z powodu stenozy, u których przed zabiegiem wykonano badanie echokardiograficzne. W zastawkach histochemicznie identyfikowano obszary kalcyfikacji oraz depozyty włókniaka będące świadectwem mikrokrwawień do zrębu płotka. Immunohistochemicznie identyfikowano naczynia (komórki śródbłonka i blaszki podstawne), a także makrofagi. Oceniano obszar kalcyfikacji, stopień rozwoju unaczynienia i mikrokrwawień, nasilenie nacieku zapalnego, a także stopień strukturalnej degeneracji płatków w zmodyfikowanej czterostopniowej skali wg Warrena i Yonga.

Badanie wykazało rozwój unaczynienia w 71% przypadków. Naczynia lokalizowały się w rejonie ogniskowych zwapnień, a także bezpośrednio pod powierzchnią płotka, częściej po stronie *ventricularis*. We wszystkich unaczynionych zastawkach naczynia miały formę kapilar o średnicy w granicach 10 - 20µm. W 54% przypadków w zastawkach występowały również cienkościenne naczynia o znacznej i zmiennej średnicy (50 - 100µm), a więc bardziej przypominające naczynia zatokowe niż typowe kapilary i dlatego zostały określone przeze mnie jako *sinusoid-like vessels* (SLV). Stopień rozwoju unaczynienia korelował ze stopniem strukturalnej degeneracji płatków, występowaniem i nasileniem mikrokrwawień, stopniem rozwoju nacieku zapalnego, a także z obecnością metaplazji kostnej w zastawce. Nie stwierdziliśmy natomiast istotnego związku rozwoju unaczynienia z echokardiograficznymi parametrami stopnia stenozy (gradient średni i maksymalny) ani obszarem kalcyfikacji.

W pracy tej po raz pierwszy zostało przeanalizowane znaczenie obecności SLV w stenotycznych zastawkach. Nie stwierdziłem związku obecności tej formy naczyń z ogólnym stopniem rozwoju unaczynienia w zastawce, natomiast wiek pacjentów u których stwierdzono obecność SLV był istotnie niższy od pozostałych. Porównanie zastawek zawierających SLV z pozostałymi unaczynionymi zastawkami pokazało istotnie większy obszar kalcyfikacji i częstsze występowanie mikrokrwawień w tych pierwszych.

Przedstawione wyniki wskazują, że rozwój unaczynienia w zastawce wiąże się ze zwiększonym naciekiem zapalnym i prowadzi do częstszych mikrokrwawień, a także wpływa na charakter kalcyfikacji ułatwiając powstanie metaplazji kostnej. Szczególnie niekorzystne

---

wyduje się być powstawanie w zastawce naczyń typu SLV, które przyczyniają się do progresji degeneracji zastawki i konieczności jej wymiany w młodszym wieku.

4. **Lis GJ**, Czapla-Masztafiak J, Kwiatek WM, Gajda M, Jasek E, Jasinska M, Czubek U, Borchert M, Appel K, Nessler J, Sadowski J, Litwin JA. Distribution of selected elements in calcific human aortic valves studied by microscopy combined with SR- $\mu$ XRF: influence of lipids on progression of calcification. *Micron* 2014;67:141-148.

Jak wcześniej wspomniałem, w rozwoju zmian wapniowych w degenerujących zastawkach oprócz wapnia i fosforu uczestniczą liczne mikroelementy i pierwiastki śladowe (np. miedź, żelazo, stront, cynk, potas). Moje własne spostrzeżenia jak i obserwacje innych autorów (Shanahan, *Circulation* 2007;116:2782-2785., Nicoll and Henein, *Int J Cardiol.* 2013;167:322-327.) wskazują, że kalcyfikacja nie jest procesem jednorodnym, a jej interakcja z lokalnym mikrośrodowiskiem może w różny sposób wpływać na kierunek i tempo rozwoju zmian w zastawce. Badanie miało na celu prześledzenie zmian w zawartości wybranych mikroelementów i pierwiastków śladowych w zastawkach w powiązaniu z ich stopniem degeneracji i obecnością lipidów w mikrośrodowisku. W badaniach zastosowano dość unikatową metodologię (w przypadku ludzkich zastawek serca użytą po raz pierwszy) łączącą rentgenowską analizę fluorescencyjną, opartą na promieniowaniu synchrotronowym (SR- $\mu$ XRF – Synchrotron Radiation Micro X-Ray Fluorescence) z klasyczną histologią i histochemią, co pozwoliło na dokonanie po raz pierwszy selektywnej analizy pierwiastkowej w mikroskopowo zdefiniowanych obszarach płatków. Oryginalność badań została zauważona w przeglądzie aktualnych najciekawszych zastosowań metod spektrometrii atomowej w badaniach dotyczących wszystkich dziedzin nauki, który został opublikowany w *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* - czasopiśmie wysoko rankingowanym w kategoriach chemii analitycznej i spektroskopii (West et al. *J Anal. At. Spectrom.* 2015;30:1839-1889).

Badaniom zostały poddane stenotyczne oraz prawidłowe zastawki aortalne. Analiza stereomikroskopowa zastawek stenotycznych i następową oceną ich skrawków barwionych histochemicznie na obecność zwapnień i lipidów ujawniły obecność trzech typów obszarów, określonych jako: normalne, pogrubiałe i zwapniałe. Obszary te reprezentowały kolejne stadia rozwoju zmian degeneracyjnych, od prawidłowej budowy (odpowiadającej morfologii zastawek prawidłowych) przez zmiany wczesne (*sclerosis*) do zmian późnych (*stenosis*). W tak zdefiniowanych obszarach dokonano analizy pierwiastkowej (Ca, P, Sr, Zn, Fe, K, Cu, S). Ponadto przeprowadzono mapowanie 2D poszczególnych pierwiastków w obszarach

normalnych, zmianach wczesnych i zmianach późnych. Badania wykazały istotny wzrost zawartości wapnia i miedzi, a także siarki już w zmianach wczesnych, co wskazuje na udział usiarczanowanych proteoglikanów macierzy we wczesnych etapach patologicznej przebudowy zastawki. Rozwój zmian późnych wiązał się przede wszystkim z istotnym wzrostem zawartości wapnia, fosforu, strontu i cynku. Zawartość wapnia w obszarach niezmiennych i zmianach wczesnych korelowała z wiekiem pacjenta. Uzyskane wyniki wskazują ponadto na związek lipidów ze składem pierwiastkowym i postępem kalcyfikacji zastawki. Zarówno w zmianach wczesnych jak i późnych obszary zawierające lipidy gromadziły istotnie więcej wapnia, fosforu i strontu niż obszary niezawierające lipidów. Jednak o ile w zmianach wczesnych koncentracje wapnia w obszarach z lipidami i bez lipidów wykazywały wzajemną korelację, o tyle w zmianach późnych takiej korelacji nie stwierdzono. Charakterystyczny dla normalnych zastawek wzrost uwapnienia z wiekiem stwierdzono również w zmianach wczesnych, przy czym wyraźnie dynamiczniejsza progresja kalcyfikacji cechowała obszary z zawartością lipidów. Co ciekawe, w obszarach bez lipidów nie wykazano istotnej różnicy w uwapnieniu zmian wczesnych i późnych. Jedynie w obszarach z lipidami koncentracja wapnia w zmianach późnych była istotnie wyższa niż w zmianach wczesnych. Wykazaliśmy ponadto, że w zmianach późnych wartość stosunku koncentracji wapnia w obszarach z lipidami do koncentracji w obszarach bez lipidów rosła istotnie wraz z wiekiem, co wskazuje na skorelowany z wiekiem wzrost znaczenia lipidów dla stopnia uwapnienia zastawki.

Nasze wyniki dowodzą istotnych różnic w składzie mikropierwiastkowym na kolejnych etapach rozwoju zmian degeneracyjnych w zastawkach oraz tego, że na wczesnych etapach rozwoju tych zmian wzrost koncentracji wapnia w mniejszym stopniu zależy od gromadzenia lipidów, co dotyczy zwłaszcza osób młodszych. Sugeruje to, że mechanizmy kalcyfikacji podlegają modyfikacjom wraz ze stopniem rozwoju zmian degeneracyjnych i z wiekiem pacjenta.

5. Czapla-Masztafiak J, Lis GJ, Gajda M, Jasek E, Czubek U, Bolechała F, Borca C, Kwiatek WM. Determination of oxidation state of iron in normal and pathologically altered human aortic valves. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 2015;364:70-75.

W kolejnych badaniach prowadzonym we współpracy z zespołem prof. Wojciecha M. Kwiatka z Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN w Krakowie wykorzystano metodę rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej w tzw. obszarze XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) w celu określenia stopnia utlenienia żelaza i jego

otoczenia chemicznego w zastawkach i określenia istniejących pod tym względem różnic pomiędzy wapniejącymi stenotycznymi zastawkami a zastawkami niezmiennymi pochodzącymi od pacjentów bez stenozы aortalnej. Odpowiednich pomiarów widm absorpcyjnych na krawędzi K żelaza dokonano z wykorzystaniem promieniowania X ze źródła synchrotronowego Swiss Light Source w Paul Scherrer Institut PSI w Villigen (Szwajcaria). Wykorzystana metoda badawcza (XANES) nie była wcześniej stosowana do analizy zastawek serca, choć jej skuteczność w ocenie tkanek ludzkich została potwierdzona w badaniach zmian nowotworowych prostaty, które były prowadzone w latach wcześniejszych przez zespół prof. Kwiatka.

Żelazo może uczestniczyć w reakcji Fentona, prowadzącej do powstawania reaktywnych chemicznie wolnych rodników w tkance ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), które powodując oksydację układów białkowo lipidowych (np. LDL – low density lipoproteins) obecnych w patologicznie zmienionych zastawkach, prowadzą do powstania ich silnie cytotoksycznych pochodnych. Badania wykazały, że widma XANES krawędzi K żelaza dla zastawek stenotycznych i zastawek niezmiennych są położone na skali energetycznej pomiędzy widmami XANES uzyskanymi dla materiałów referencyjnych, reprezentatywnych odpowiednio dla  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ , co wskazuje na obecność w zastawkach żelaza na obu stopniach utlenienia. Jednak bliskość widma XANES dla  $\text{K}_2\text{Zn}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  zawierającego żelazo na trzecim stopniu utlenienia wskazuje, że  $\text{Fe}^{3+}$  jest dominującą formą żelaza w zastawkach. Z porównania położenia krawędzi absorpcji dla widm zastawek stenotycznych i normalnych wynika, że w zastawkach patologicznie zmienionych proporcja żelaza na trzecim stopniu utlenienia jest większa niż w zastawkach niezmiennych. Kształt widm zastawkowych zbliżony do widma heminy (pochodnej hemu) sugeruje natomiast, że otoczenie chemiczne żelaza jest tu zbliżone do występującego m. in. w hemoglobinie. W badaniach dokonano także analizy tzw. piku przedkrawędziowego w widmach XANES, którego intensywność jest czuła na zmiany spinowe oraz zmiany w geometrii wokół badanego atomu. Porównanie położenia i intensywności tego obszaru widma wykazało, że nie ma znaczących różnic w lokalnej symetrii ani stanie spinowym atomów żelaza pomiędzy oboma badanymi typami zastawek.

Uzyskane wyniki wskazują, że wyższy poziom żelaza na trzecim stopniu utlenienia może być wynikiem zachodzenia reakcji Fentona w degenerujących zastawkach, co przyczynia się do zwiększenia stresu tkankowego i może prowadzić do progresji zmian.

---

6. **Lis GJ**, Czubek U, Jasinska M, Jasek E, Loboda A, Dulak J, Nessler J, Sadowski J, Litwin JA. Elevated serum osteoprotegerin is associated with decreased osteoclastic differentiation in stenotic aortic valves. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65:377-82.

Opisany przeze mnie w pierwszej publikacji prezentowanego cyklu przypadek pełnej metaplastyki kostnej w homografacie i spotykane jedynie w niektórych badanych zastawkach natywnych przypadki przemiany kostnej oraz publikowane w ostatnich latach doniesienia o podwyższonym poziomie OPG w surowicy pacjentów ze stenozą aortalną jak również dane sugerujące udział układu OPG/RANK/RANKL w patomechanizmie zmian zastawkowych skłoniły mnie do zbadania czy poziom OPG i RANKL w surowicy krwi pacjentów ze stenozą aortalną ma związek z charakterystyką zmian histopatologicznych w zastawce.

Badaniom poddano 35 trójpłatkowych zastawek aortalnych wśród których 27 pochodziło od pacjentów operowanych z powodu stenozy i u których przed zabiegiem mierzony był poziom OPG i sRANKL w surowicy. Pozostałe zastawki, niezmienione w ocenie makroskopowej zostały pobrane od osób zmarłych z przyczyn losowych i stanowiły grupę porównawczą. Pomiaru OPG i sRANKL w surowicy dokonano również u 12 osób bez stenozy aortalnej i nieróżniących się istotnie pod względem płci i wieku od grupy badanej.

W zastawkach histochemicznie identyfikowano obszary kalcyfikacji oraz lipidy i lipoproteidy. Metodami immunohistochemicznymi identyfikowano makrofagi (CD68), naczynia (CD34) oraz komórki wykazujące ekspresję białka TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) uznawanego za marker komórek osteoklastycznych. Makroskopowo i mikroskopowo, z zastosowaniem metod morfometrycznych oceniano rozległość zwapnień i ich lokalizację, akumulację lipidów i lipoprotein, stopień rozwoju unaczynienia i nacieków zapalnych.

Poziom OPG w surowicy chorych ze stenozą aortalną był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej. Co ciekawe poziom OPG miał związek z obecnością w stenotycznych zastawkach komórek wykazujących ekspresję enzymu markerowego dla osteoklastów (TRAP). O ile w grupie pacjentów, u których w zastawkach stwierdzono obecność tego fenotypu komórek poziom OPG w surowicy krwi nie był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej, o tyle w przypadkach bez cech osteoklastogenezy obserwowano istotnie wyższy poziom OPG niż w grupie kontrolnej, a także istotnie wyższy niż w grupie z komórkami TRAP-pozytywnymi. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że OPG jest czynnikiem predykcyjnym obecności komórek TRAP-pozytywnych i jej wysoki poziom w surowicy wiąże się z zahamowaniem osteoklastogenezy w stenotycznej zastawce. Warto zaznaczyć, że w grupie zastawek z TRAP-



---

pozytywnymi komórkami jedynie w 4 przypadkach (29%) stwierdzono obecność w pełni wykształconych wielojądrzastych komórek osteoklastycznych. Badanie wykazało ponadto mniejszy udział lipidów i częstszą obecność kalcyfikacji płatków w rejonie pierścienia zastawkowego w grupie zastawek z cechami osteoklastogenezy.

Publikacja ta jest pierwszym doniesieniem świadczącym o możliwości istnienia związku między poziomem OPG w surowicy chorych ze stenozą aortalną, a możliwością różnicowania się w kierunku osteoklastycznym komórek pochodzenia monocytarnego obecnych w degenerującej zastawce. Wyniki wskazują na OPG jako interesujący czynnik potencjalnie mogący wpływać na kierunek procesów patologicznych w zastawce.

7. **Lis GJ**, Czubek U, Jasek-Gajda E, Łoboda A, Dulak J, Nessler J, Kapelak B, Sadowski J, Litwin JA. Influence of osteoclasts and osteoprotegerin on the mode of calcific degeneration of aortic valves. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126:149-158.

W poprzedniej pracy wykazaliśmy związek OPG z pojawieniem się w zastawce komórek wykazujących ekspresję TRAP, białka uznawanego za marker osteoklastów. Wskazuje to na występujące przy niskim poziomie OPG w surowicy różnicowanie się części komórek pochodzenia monocytarnego w osteoklasty. Jednak niewielka liczba przypadków pełnej osteoklastogenezy (obecności w pełni zróżnicowanych, wielojądrzastych osteoklastów w zastawce) uniemożliwiła selektywną analizę tej ciekawej, lecz stosunkowo rzadkiej grupy przypadków. Dlatego podjąłem próbę zgromadzenia większej, bardziej reprezentatywnej grupy takich przypadków i jej wnikliwszą analizę.

Różnicowanie i rekrutacja osteoklastów w tkankach szkieletowych jest głównie kontrolowana przez układ OPG/RANK/RANKL. Badania ostatnich lat wykazały, że RANKL jest również produkowany przez limfocyty T, co wskazuje, że układ OPG/RANK/RANKL w jakimś sensie może integrować rozwój i metabolizm kostny z procesami zapalnymi i aktywnością układu immunologicznego. Choć pierwsze informacje o możliwości wpływu komórek układu immunologicznego na tkankę kostną pochodzą z przed około 40 lat, dopiero obecne odkrycia doprowadziły do utworzenia nowej dziedziny badań – osteoimmunologii (termin zaproponowany przez Arron i Choi – *Nature*; 2000). Fakty te skłoniły mnie do uwzględnienia w badaniu również markerów zapalnych, zwłaszcza tych, których wpływ na osteoklastogenezę i/lub tworzenie kości był już uprzednio sugerowany w badaniach na zwierzętach lub in vitro.

Celem badania była ocena, czy krążące OPG, sRANKL i inne markery metabolizmu

kostnego mogą być predyktorem obecności dojrzałych osteoklastów w stenotycznej zastawce oraz ocena związku obecności tych komórek z formą degeneracji zastawki. Do badań zakwalifikowano 60 pacjentów ze stenozą aortalną u których dokonano chirurgicznej wymiany zastawki aortalnej i którzy następnie zostali podzieleni na dwie grupy: osteoklastyczną i nieosteoklastyczną zależnie od obecności lub braku w usuniętych zastawkach osteoklastów definiowanych jako duże, wielojądrzaste komórki wykazujące koekspresję TRAP i katepsyny K, potwierdzoną badaniem w mikroskopie konfokalnym. Jest to pierwsze badanie analizujące tak wyselekcjonowaną grupę, co stanowi istotną różnicę w stosunku do pojedynczych badań na ludzkich zastawkach biorących za punkt odniesienia wszystkie TRAP-pozytywne komórki w zastawce, niezależnie od ich jedno- czy wielojądrzastego charakteru. Przed zabiegiem mierzyliśmy poziom OPG, sRANKL, osteokalcyny, osteopontyny, TNF $\alpha$ , IL-1b, IL-6 w surowicy pacjentów. Mikroskopowo, z zastosowaniem metod morfometrycznych oceniano rozległość zwapnień w zastawkach, akumulację lipidów, neowaskularyzację i liczbę/fenotyp makrofagów.

Pacjenci z osteoklastami w zastawce cechowali się istotnie niższym poziomem OPG i TNF $\alpha$  w surowicy oraz rzadziej chorowali na cukrzycę. W wieloczynnikowej analizie wykazaliśmy po raz pierwszy, że predyktorami obecności dojrzałych osteoklastów w stenotycznej zastawce są niski poziom OPG w surowicy i cukrzyca (odpowiednio dodatni i ujemny predyktor). Po raz pierwszy również scharakteryzowaliśmy lokalne śródzastawkowe środowisko wiążące się z obecnością dojrzałych osteoklastów. W zastawkach tych istotnie częściej niż w zastawkach bez osteoklastogenezy obserwowano występowanie metaplastji kostnej, liczniejsza była zarówno całkowita populacja jak i typ M2 (antyzapalny) makrofagów, a także stwierdzono bardziej nasilone tworzenie naczyń, natomiast mniejszą zawartość lipidów.

W badanej przez nas populacji stwierdziliśmy nieliniowy (szybszy > 65 roku życia) wzrost OPG z wiekiem, co potwierdza wyniki badań innych autorów. Porównanie grupy osteoklastycznej i nieosteoklastycznej w tym zakresie wykazało w obu grupach istotny wzrost OPG z wiekiem. Co ciekawe jednak, znacznie większą siłą tego związku zaobserwowano w grupie osteoklastycznej niż w grupie nieosteoklastycznej ( $r = 0,9$ ;  $p = 0,0001$  i  $r = 0,39$ ;  $p = 0,007$  odpowiednio), co sugeruje, że w przypadkach osteoklastycznych mamy do czynienia z sytuacją w której wzrost OPG z wiekiem jest w jakimś sensie „naturalny”, podobnie jak stwierdzany wraz z wiekiem wzrost zawartości wapnia w zastawkach u ludzi zdrowych. Z drugiej strony wydaje się możliwe, że to nie bezwzględny poziom OPG, a raczej poziom w stosunku do wieku pacjenta wpływa promująco lub hamująco na możliwość powstania osteoklastów w zastawce.

Istotne jest również wykazanie przez nas silnej negatywnej korelacji kalcyfikacji z wiekiem w grupie osteoklastycznej ( $r = -0,79$ ,  $p = 0,002$ ), czego nie obserwowano w grupie nieosteoklastycznej ( $r = 0,09$ ;  $p = 0,5$ ). Zależność ta, choć słabsza, występowała również dla wszystkich przypadków z niskim OPG, to znaczy mieszczącym się w zakresie wartości obserwowanych w grupie osteoklastycznej ( $r = -0,5$ ;  $p = 0,002$ ). Co ciekawe, dla pozostałych przypadków (wysokie OPG) obserwowano w zasadzie odwrotną (dodatnią) zależność, choć była ona jedynie na granicy istotności ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,05$ ).

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że obecność osteoklastów związana z niskim w stosunku do wieku poziomem OPG w surowicy jest cechą mikrośrodowiska zdolnego do samoograniczania postępu kalcyfikacji degenerujących zastawek. Skłoniło mnie to do wyróżnienia szczególnego wariantu degeneracji zastawek, określonego jako proresorpcyjny i charakteryzującego się niskim w stosunku do wieku poziomem OPG w surowicy, a lokalnie obecnością w zastawce mikrośrodowiska z istotnym udziałem makrofagów M2 (antyzapalnych), rozwojem unaczynienia i metaplastji kostnej przy mniejszej zawartości lipidów i z aktywnymi mechanizmami ograniczającymi rozwój kalcyfikacji.

Postulowane w tej pracy zróżnicowanie patomechanizmu rozwoju degeneracji wapniowej zastawki aortalnej może mieć istotne znaczenie kliniczne (co zostało podkreślone w komentarzu redakcyjnym poprzedzającym publikację - *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126:121-123), sugerując przyczynę trudności we wprowadzeniu terapii nakierowanej na modyfikację układu OPG/RANK/RANKL, która byłaby skuteczna u szerokiego spektrum pacjentów.

## **Podsumowanie**

Pomimo coraz liczniejszych w ostatnich latach badań, zarówno podstawowych jak i klinicznych, zmierzających do znalezienia skutecznej metody zapobiegającej lub opóźniającej powstawanie zmian w zastawkach aortalnych, brak jest spektakularnych sukcesów w tej dziedzinie (jak dowodzą badania nad zastosowaniem statyn czy denosumabu). Moje wyniki są zgodne z tezą, że w degeneracji wapniowej zastawek bierze udział szereg aktywnych mechanizmów prowadzących nie tylko do destrukcji tkanki, ale również do jej patologicznej przebudowy. W przypadku homografitów przebudowa ta jest jednak dość ograniczona. Prezentowane publikacje zwracają uwagę na fakt, że stenotyczne zastawki różnią się nie tylko stopniem rozwoju określonych, jednorodnych procesów patologicznych (jak np. kalcyfikacja, naciek zapalny, unaczynienie), ale również wykazują istotne różnice dotyczące form tych procesów (np. kalcyfikacja dystroficzna vs osyfikacja, makrofagi prozapalne M1 vs

antyzapalne M2, drobne kapilary vs naczynia typu SLV), a także występowania bądź braku niektórych zjawisk patologicznych (osteoklasty, kość, chrząstka, naczynia, mikrowylewy). Sprawę komplikuje również fakt, że degeneracja zastawek jest procesem przewlekłym i jak dowodzą m. in. uzyskane przeze mnie wyniki, znaczenie/występowanie niektórych czynników może się zmieniać z wiekiem pacjenta i progresją zmian w zastawce (np. OPG, lipidy, osteoklasty).

Fakty te wskazują na celowość wyodrębnienia i scharakteryzowania bardziej homogennych form degeneracji zastawek i związanych z tym bardziej jednolitych grup pacjentów u których, jak uważam, łatwiej będzie prowadzić skuteczną terapię opóźniającą/hamującą rozwój zmian zastawkowych. Dlatego zaproponowałem wyróżnienie dwóch wariantów degeneracji opisanych w ostatniej prezentowanej publikacji włączonej do powyższego cyklu i obecnie kontynuuję prace w tym zakresie.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.**

Moje prace naukowo-badawcze koncentrowały się wokół następujących zagadnień.

### Histopatologia układu sercowo-naczyniowego.

Do grupy tej należy zaliczyć również prace stanowiące osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego i omówione w części nr 4 autoreferatu.

Moje wczesne badania dotyczyły ludzkich zastawek homogennych. Zagadnienia te stanowiły również temat mojej rozprawy doktorskiej w której opisałem morfologię i właściwości fizyczne homograftów aortalnych. Zastawki te były wszczepiane w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych w Klinice Chirurgii Serca i Naczyń Collegium Medicum UJ i usuwane w latach kolejnych z powodu dysfunkcji. W pracach: *Mineralization and organic phase modifications as contributory factors of accelerated degeneration in homograft aortic valves. (2003) J Heart Valve Dis.;12:741-51* oraz *Age-dependent changes in elastic components of human aortic valve leaflets, histological analysis of explanted allografts and valves prepared for grafting. (2004) Acta Cardiol.;59:212-3* wykazałem, że destrukcja homograftu przejawia się zmniejszeniem liczby komórek zrębu, utratą integralności warstw i połączeń między nimi, zanikiem falistego przebiegu włókien kolagenowych w warstwie włóknistej zastawki (*fibrosa*), redukcją elementów elastycznych i składników macierzy, zatarciem warstwowej budowy płątka oraz jego kalcyfikacją. Elementy elastyczne okazały się

---

stosunkowo trwałym składnikiem zastawek, a spadek ich liczby w homograftach korelował z rzeczywistym wiekiem wszczepionych zastawek oraz czasem trwania przeszczepu. W porównawczej grupie złożonej z prawidłowych zastawek spadek ilości elementów elastycznych był nierównomierny w różnych przedziałach wieku z okresem względnej stabilności między 25 a 40 rokiem życia.

Istotnym spostrzeżeniem było wyróżnienie w zastawkach dwóch form kalcyfikacji o przypuszczalnie niejednakowym wpływie na ich morfologię i trwałość. Pierwsza - o jednoznacznie niekorzystnym wpływie - to duże, dobrze ograniczone zwapniałe ogniska o różnym stopniu wysycenia, niejednokrotnie prowadzące do znacznych deformacji płątka. Ich podłożem mogą być skrzepliny, ogniska martwicze, czy zwłóknienia pozapalne. Druga forma - drobinowa (molekularna) - to rozsiane drobne zwapnienia niewidoczne makroskopowo i występujące zwłaszcza przy powierzchni *fibrosa*.

Ponieważ w badanych przeze mnie homograftach największą trwałością i stopniem zachowania warstwowej struktury cechowały się płatki zastawek o umiarkowanym, a nie najniższym stopniu kalcyfikacji drobinowej, jako jeden z pierwszych zasugerowałem, że znaczenie rozwoju kalcyfikacji w homografcie dla jego trwałości zależy nie tylko od stopnia jej nasilenia, ale również od formy, a kalcyfikacja drobinowa w pewnym zakresie może korzystnie oddziaływać na trwałość homograftu.

W zgodzie z powyższą tezą pozostają wyniki innych moich badań [*Wpływ rozproszenia złogów wapnia na trwałość allogennyh aortalnych zastawek serca. Fazowość mineralizacji. (2004) Przegl Lek.;61:613-6.*] w których wykazałem, że trwałość homograftu koreluje ze stopniem rozproszenia depozytów wapniowych, a nie z całkowitą zawartością wapnia. Zdefiniowany przeze mnie współczynnik rozproszenia złogów wapniowych jest zatem dobrym parametrem opisującym procesy mineralizacyjne w zastawce. W pracy tej wykazałem ponadto dwufazową zależność między zawartością wapnia w homografcie, a rozległością kalcyfikacji.

Ponadto w badaniach zastawek prowadzonych *in vitro* wykazałem, że w niewielkich stężeniach jony galu mogą hamować kalcyfikację homograftów [*Effect of gallium on in vitro aortic homograft valve cusp mineralization. (2004) Acta Cardiol.;59:195-6.*].

Wyniki moich badań nad homografiami dowodzą, że ich trwałość jest związana z trzema grupami czynników: (1) stanem wszczepianej zastawki (czas przechowywania zastawki w banku, wiek dawcy), (2) charakterystyką kliniczną biorcy (młody wiek, infekcja wsierdza, kalcyfikacja własnej zastawki, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia lipidowe), (3) optymalizacją doboru zastawki (różnicą wieku między biorcą i dawcą).

---

Kontynuowana od roku 2010 współpraca z Oddziałem Zastosowań Fizyki i Badań Interdyscyplinarnych Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN w Krakowie kierowanym przez prof. Wojciecha M. Kwiatka umożliwiła mi zastosowanie w badaniach zastawek zaawansowanych i nowatorskich na tym polu technik badawczych (SRIXE, FTIR, XANES) w połączeniu z tradycyjnymi metodami histologicznymi. Aspekty metodyczne badań zostały przedstawione w trakcie warsztatów naukowych w Bordeaux w 2011 r. [*Imaging of surgically excised human stenotic aortic valves by means of SR- $\mu$ XRF and  $\mu$ FTIR techniques*. 4th Imaging Techniques With Synchrotron Radiation (ITSR) Workshop] i w Hamburgu w 2012 r. [*Distribution of selected elements in pathologically altered human aortic valves studied by SR- $\mu$ XRF*. European XFEL Users' Meeting and HASYLAB Users' Meeting], a część wyników badań została opisana w publikacjach wchodzących w skład przedłożonego jednotematycznego cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe.

Odrębnym zagadnieniem z zakresu układu naczyniowego były prowadzone we współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii CMUJ badania *in vitro* dotyczące zachowania śródbłónka i wazodylatacji tętnicy promieniowej pod wpływem czynników farmakologicznych stosowanych do jej predylatacji u chorych poddawanych operacji pomostowania aortalno-wieńcowego. W pierwszej fazie badań porównano stosowanie milrinonu i papaweryny [*Vasodilatory effect and endothelial integrity in papaverine- and milirone-treated human radial arteries*. (2013) *J Physiol Pharmacol.*;64:41-45.]. Wykazano korzystniejsze działanie papaweryny (1 mg/ml) w stosunku do milrinonu (0,4 mg/ml) zarówno w zakresie zachowania integralności śródbłónka jak i efektu wazorelaksacyjnego. W drugiej, kończącej obecnie fazie badań porównywane jest działanie papaweryny stosowanej w różnych stężeniach.

Innym zagadnieniem z tej grupy są prowadzone we współpracy z Kliniką Nefrologii CMUJ badania nad czynnikami wpływającymi na wapnienie naczyń tętniczych i związek tych zmian z ryzykiem sercowo-naczyniowym w przypadkach przewlekłej niewydolności nerek. W publikacjach: *Increased fasting glucose as a predictor for radial artery calcification in end stage renal disease patients*. (2013) *Int J Endocrinol.*;2013:969038 oraz *Cardiovascular risk in chronic kidney disease patients: intima-media thickness predicts the incidence and severity of histologically assessed medial calcification in radial arteries*. (2015) *BMC Nephrol.*;16:78 wykazaliśmy, że poziom OPG w surowicy jest niezależnym predyktorem określonego ultrasonograficznie wskaźnika kompleksu intima-media tętnicy szyjnej wspólnej, który może stanowić wartościową metodę oceny ryzyka ogólnoustrojowych zwapnień w naczyniach i identyfikować przypadki wysokiego ryzyka śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych



---

u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. Ponadto nieprawidłowy poziom glikemii na czczo i cukrzyca wiązały się z wyższym poziomem OPG i korelowały z ocenianą histologicznie kalcyfikacją tętnicy promieniowej u chorych ze schyłkową niewydolnością nerek.

#### Histopatologia ludzkiej przysadki mózgowej.

Badania dotyczyły oceny charakteru i częstości występowania zmian w ludzkiej przysadce mózgowej i obejmowały reprezentatywną grupę 152 przysadek pobranych w trakcie badań sądowo-lekarskich w Katedrze Medycyny Sądowej od osób zmarłych z przyczyn losowych. W publikacji *Incidence of pituitary necrotic lesions in autopsy material. (2008) Pol J Pathol.;59:97-100* opisaliśmy po raz pierwszy częstość zmian w przysadce w populacji polskiej. Wykazaliśmy stosunkowo częste występowanie mikrogruczolaków (ok. 30% dorosłej populacji), z tendencją do wzrostu ich częstości wraz z wiekiem. Dokonaliśmy również immunohistochemicznej klasyfikacji mikrogruczolaków. W ponad ¼ przypadków stwierdziliśmy typ niewydzielający, natomiast w przypadku mikrogruczolaków wydzielających, ponad połowę stanowiły guzy polihormonalne. Badania wykazały również stosunkowo częste występowanie w przysadce patologicznych zmian pęcherzykowych (35%) i zmian martwiczych (19%). Subkliniczne zmiany martwicze w sposób istotny wiązały się z wiekiem i nie występowały u osób poniżej 40 roku życia.

W kolejnej pracy *Microvessel density and area in pituitary microadenomas. (2009) Endocr Pathol.;20:221-6*, porównaliśmy unaczynienie mikrogruczolaków z unaczynieniem obszarów niezmiennych w przysadce. Badanie wykazało, że wczesne zmiany gruczolakowe są beznaczyniowe (40%) lub istotnie słabiej unaczynione niż sąsiadujące obszary narządu.

Bardzo ciekawym i zupełnie nowym spostrzeżeniem było stwierdzenie związku samobójczej przyczyny zgonów z występowaniem mikrogruczolaków przysadki opisane w publikacji *Increased incidence of pituitary microadenomas in suicide victims. (2007) Neuropsychobiology;55:163-6*. W wieloczynnikowej analizie regresji logistycznej wykazaliśmy, że obecność mikrogruczolaka jest niezależnym od płci, wieku i depresji czynnikiem blisko dwukrotnie zwiększającym ryzyko popełnienia samobójstwa. Wyjaśnienie mechanizmów tej zależności wymaga jednak dalszych badań.

#### Optymalizacja regeneracji ubytków błony śluzowej jamy ustnej.

Badania prowadzone na modelu zwierzęcym (króliki) dotyczyły oceny szybkości i jakości gojenia doświadczalnych ubytków śluzówki policzka, z zastosowaniem

autologicznych, hodowanych *in vitro* keratynocytów zawieszonych w kleju fibrynowym. Badania te, opisane w publikacji *Effect of cultured autologous oral keratinocyte suspension in fibrin glue on oral wound healing in rabbits. (2012) Int J Oral Maxillofac Surg.;41:1146-52*, stanowiły część eksperymentalną projektu realizowanego wspólnie z Zakładem Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji Instytutu Stomatologii CMUJ. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie autologicznych keratynocytów przyspiesza epitelizację i prowadzi do zmniejszenia nacieku zapalnego w obszarze gojącej się rany, dając szybsze wygojenie i dobry efekt wizualny.

W trakcie prowadzonych badań wykazano ponadto, że komórki podstawne odtwarzanego nabłonka wykazują immunopozytywność epitopu charakterystycznego dla króliczych makrofagów i rozpoznawanego przez przeciwciało monoklonalne RAM11 [*Macrophage-specific RAM11 monoclonal antibody cross-reacts with basal cells of stratified squamous epithelia. (2007) Folia Histochem Cytobiol.;45:229-32.*]. Poszerzone badania w tym zakresie wykazały, że RAM11 może być markerem komórek warstwy podstawnej w różnych króliczych nabłonkach wielowarstwowych płaskich (zarówno rogowaciejących jak i nierogowaciejących). Nasze wyniki opisane w publikacji *Expression of basal cell marker revealed by RAM11 antibody during epithelial regeneration in rabbits. (2010) Folia Histochem Cytobiol.;48:89-92*, sugerują ponadto, że immunopozytywność RAM11 jest związana z dojrzewaniem komórek podstawnych w nabłonku.

#### Histologia i immunohistochemia zmian melanocytowych i niemelanocytowych skóry.

Badania były prowadzone we współpracy z Kliniką Dermatologii UJ CM. Dotyczyły głównie oceny ekspresji wybranych cyklin w różnych typach zmian melanocytowych skóry. Immunohistochemicznym badaniom poddano zmiany skórne zdiagnozowane dermatoskopowo i po usunięciu zweryfikowane histologicznie jako znamiona zwykłe, dysplastyczne lub zmiany czerniakowe.

Badania przedstawione w publikacjach: *Cyclin D1 and D3 expression in melanocytic skin lesions. (2010) Arch Dermatol Res.;302:545-50* oraz *Expression of cyclins A and E in melanocytic skin lesions and its correlation with some clinicopathologic features. (2012) Folia Histochem Cytobiol.;50:263-9* wykazały istotne różnice w ekspresji cyklin A, E i D3, która stopniowo wzrastała od znamion zwykłych, przez dysplastyczne do przypadków czerniaka. W odróżnieniu wyników wcześniejszych badań sugerujących całkowity brak ekspresji cykliny D1 w znamionach zwykłych, w badanym materiale stwierdziliśmy również w tych przypadkach niewielki procent (0,34%) cyklin D1-pozytywnych jąder komórkowych. Wyniki wskazują, że

immunohistochemiczne oznaczanie cyklin A, E, i D3 może być przydatne w różnicowaniu przypadków czerniaka i znamion dysplastycznych niejednoznacznych w rutynowej ocenie histopatologicznej.

W innej pracy z tej grupy zagadnień [*Dermoskopowy obraz raka podstawnokomórkowego skóry. (2008) Dermatologia Estetyczna;10:234-239.*] opisano dermatoskopowe kryteria rozpoznania i różnicowania raka podstawnokomórkowego skóry oraz podstawy histologiczne symptomatycznych obrazów obserwowanych w diagnostyce dermatoskopowej.

#### Badania *in vitro* lekowrażliwości komórek ludzkich linii białaczkowych.

Badania dotyczyły oceny wpływu leków z grupy inhibitorów deacetylazy histonów i inhibitorów polimeraz poli(ADP-rybozy) (PARP) na żywotność, proliferację, apoptozę, mitochondrialny potencjał błonowy ( $\psi_m$ ) i cykl komórkowy ludzkich linii komórek białaczkowych. W pierwszym eksperymencie badano działanie trichostatinu A i kwasu walproinowego na wywołaną etopozydem apoptozę komórek białaczkowych linii HL60 i U937. Wykazano synergistyczny cytotoksyczny efekt działania kombinacji badanych inhibitorów z etopozydem oraz nasilenie apoptozy w przypadku linii HL60 [*Effect of histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on etoposide-induced apoptosis in leukemic cells. (2012) Anticancer Res.;32:2791-9.*]

W drugim eksperymencie przeprowadzonym na liniach komórkowych HL60, MOLT4, U937 i K562 oceniano wpływ inhibitora PARP (PJ34) i inhibitora deacetylazy histonów (Vorinostat) oraz efekt ich działania skojarzonego [*Combinatorial Effects of PARP Inhibitor PJ34 and Histone Deacetylase Inhibitor Vorinostat on Leukemia Cell Lines. (2014) Anticancer Res.;34:1849-56.*]. Inkubacja z PJ34 nie wpływała znacząco na badane parametry. W przypadku Vorinostatu stwierdzono zahamowanie proliferacji, wzrost częstości apoptozy, obniżenie  $\psi_m$  oraz zwiększenie odsetka komórek w fazie sub-G1 w przypadku wszystkich badanych linii komórkowych. Ponadto dla linii HL60, MOLT4, i K562 wykazano synergistyczny antyproliferacyjny i proapoptotyczny efekt PJ34 i Vorinostatu.

#### Pozostałe badania.

- Badania nakierowane na zagadnienia metodologiczne.
  1. Przedstawiono oryginalny protokół w metodzie immunofluorescencji pośredniej pozwalający zmniejszyć świecenie tła i zwiększyć intensywność sygnału [*Triple*

- 
- immunofluorescence labeling of atherosclerotic plaque components In apoE/LDLR -/- mice. (2008) Folia Histochem Cytobiol.;46:143-6].*
2. Wykazano przydatność przeciwciała monoklonalnego LN-5 do znakowania ludzkich sebocytów w świeżo przygotowanych i archiwalnych próbkach tkanek zatapiających rutynowo w parafinie [*LN-5 antibody against human macrophages cross-reacts with routinely processed human sebaceous glands. (2012) Folia Histochem Cytobiol.;50:319-21].*
  3. Przedstawiono zastosowanie komputerowej analizy morfometrycznej w oparciu o oprogramowanie Java ImageJ v. 1.46d dla oceny struktury histologicznej nerwu pośrodkowego człowieka [*The use of computer-assisted image analysis in measuring the histological structure of the human median nerve. (2012) Folia Morphol.;71:82-5].*
  4. Oceniono przydatność materiału pozyskanego w trakcie badania autopsyjnego do sporządzania preparatów mikrokorozyjnych łożyska naczyniowego przeznaczonych do analizy w elektronowym mikroskopie skaningowym. [*Quality of corrosion specimens prepared from material obtained during autopsies – a preliminary study. (2013) Folia Med Cracov.;53,5-12].*
- Ocena czasu pojawienia się i topograficznej lokalizacji włókien nerwowych zawierających galaninę w trakcie rozwoju kości piszczelowej szczura [*Development of galanin-containing nerve fibres in rat tibia. (2009) Anat Histol Embryol.;38:112-7].*
  - Występowanie mastocytów w polipach eozynofilowych i neutrofilowych jamy nosowej [*Mastocyty w polipach eozynofilowych i neutrofilowych nosa. Badania cytologiczne i histologiczne. (1998) Otolaryngol Pol.;52:321-6].*
  - Charakterystyka unaczynienia prawidłowej i patologicznie zmienionej ludzkiej macicy. [*Blood vessels of the intratumoral septa in uterine leiomyomata.(2013) Folia Med Cracov.;53,99-106 oraz 'Venous lakes' - a corrosion cast scanning electron microscopy study of regular and myomatous human uterine blood vessels. (2014) Folia Morphol.;73:164-8].*
-

➤ Prace kazuistyczne

1. Morfologiczna i immunohistochemiczna analiza przypadku rzadko spotykanego guza (hamartoma) w nietypowej lokalizacji. [*Respiratory epithelial adenomatoid hamartoma of the anterior nasal septum a rare localisation of an unusual tumour in a child: a case report. (2009) Cases J.;16;2:8151*].
2. Opis przypadku guza Schwannoma w rzadkiej lokalizacji (w części policzkowej jamy ustnej) uzupełniony o analizę histochemiczną i immunofluorescencyjną [*Giant schwannoma of the cheek--a comprehensive histological and immunohistochemical description of a rare tumour. (2009) Pol J Pathol.;60:52-6*].

➤ Prace poglądowe

W dwóch pracach poglądowych, których jestem jedynym autorem, opisałem udział nerkowego układu renina-angiotensyna w regulacji homeostazy wodno-elektrolitowej [*Nerkowy układ renina-angiotensyna w regulacji homeostazy wodno-elektrolitowej. (1999) Przegl Lek.;56:164-8*] oraz zespół pseudoeksfoliacji (PEX) gałki ocznej [*Patologia i histopatogeneza zmian rzekomozłuszczeniowych. Choroba gałki ocznej czy też oczna manifestacja uogólnionego procesu. (2006) Przegl Lek.;63:588-92*].

W innej pracy przedstawiliśmy wyniki systematycznej analizy piśmiennictwa dotyczącego ludzkiej zuchwy w aspekcie anatomicznym, embriologicznym i antropologicznym [*The mandible and its foramen: anatomy, anthropology, embryology and resulting clinical implications. (2013) Folia Morphol.;72:285-292*].

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 38 pełnotekstowych publikacji w czasopismach naukowych, w tym 27 w czasopismach posiadających *Impact Factor* (IF). Wśród powyższych publikacji 31 to prace oryginalne (25 z IF), 3 to opisy przypadku (1 z IF) a 4 to prace poglądowe (1 z IF). Ponadto jestem współautorem rozdziału w podręczniku akademickim, a także współautorem 29 referatów i doniesień zjazdowych, w tym 16 prezentowanych na konferencjach i sympozjach międzynarodowych. Brałem udział w 17 projektach badawczych, w tym w 4 jako kierownik projektu.

Istotną częścią mojej pracy jest działalność dydaktyczna, a w ostatnich latach liczba moich godzin dydaktycznych wynosi ponad 500 rocznie. Pierwsze zajęcia, laboratoria

dotyczące technik mikroskopowych (dla studentów Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego AM) oraz repetytoria mikroskopowe (dla studentów Wydziału Lekarskiego i Oddziału Stomatologii) prowadziłem już w czasie studiów. Po ich ukończeniu i zatrudnieniu w Katedrze Histologii prowadziłem zajęcia z histologii i cytofizjologii dla studentów studiów kierunku lekarskiego i lekarsko-dentystycznego, a także analityki medycznej, pielęgniarstwa, fizyki medycznej oraz zajęcia dla studentów fizyki medycznej i dozymetrii Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Prowadzę również zajęcia w języku angielskim na kierunku lekarskim i lekarsko-dentystycznym w Szkole Medycznej dla Obcokrajowców UJ CM, a od 2013 roku, w związku z utworzeniem w Krakowie Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej również, zajęcia na kierunku weterynaria.

Od 2013 roku jestem członkiem Klubu „Laudatio Docendi” zrzeszającego nauczycieli akademickich Wydziału Lekarskiego UJ CM posiadających wybitne kwalifikacje i osiągnięcia dydaktyczne, a w latach 2003, 2008, 2009, 2010 i 2012 kurs histologii na którym prowadzę zajęcia (MD program for High School graduates) uznany został przez absolwentów Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców UJ CM za najlepszy kurs przedklinikczny.



*dr n. med. Grzegorz J. Lis*