



Ocena dorobku naukowego oraz rozprawy habilitacyjnej Dr Bogusławy Luzak
Tytuł pracy: **„Mechanizmy działania wybranych substancji modulujących funkcje płytek krwi w układach modelowych i stanach klinicznych”**

Dr Bogusława Luzak ukończyła biologię na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi na Uniwersytecie Łódzkim, uzyskując w roku 1997 dyplom magistra biologii ze specjalnością biofizyki. Po studiach, w latach 1997–2004 pracowała w Państwowym Szpitalu Klinicznym Nr 1 im. Norberta Barlickiego Akademii Medycznej w Łodzi na stanowisku młodszego asystenta. Następnie w latach 2004 – 2007 pracowała na stanowisku asystenta w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi w Katedrze Diagnostyki Laboratoryjnej UM w Łodzi. Od 2007 roku do chwili obecnej pracuje na stanowisku adiunkta w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi w Katedrze Nauk Biomedycznych, pod kierunkiem Prof. dr hab. Cezarego Watały. W roku 2003, na Wydziale Lekarskim UM w Łodzi pod promotorstwem Prof. dr hab. Cezarego Watały, obroniła pracę doktorską pt: *„Rola polimorfizmu 807 C/T genu GPIa, podjednostki receptora dla kolagenu GPIIb/IIIa, w kształtowaniu reaktywności płytek krwi”*. Wyniki prac badawczych wykonanych w ramach rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w 2003 roku w J. Biomed. Sci. (*„Effect of the 807 C/T polymorphism in glycoprotein Ia on blood platelet reactivity”*) oraz były prezentowane na kongresie naukowym w Australii (2005). W roku 2003 dr Bogusława Luzak uzyskała też prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego na obszarze Rzeczypospolitej Polskiej.

Habilitantka kierowała pracami badawczymi, które wykonywała w ramach projektów badawczych finansowanych przez KBN (2 granty w 1999 i 2001), przez NCN (1 grant w latach 2008-2011) przez UMED w Łodzi (2010) oraz kierowała projektem finansowanym przez UE (2009-2013). Była także konsultantem w projekcie UE (2010-2015) oraz współwykonawcą 8 projektów KBN/NCN.

Działalność naukowa dr Bogusławy Luzak była wielokrotnie nagradzana: w 2003 roku otrzymała Nagrodę Zespołową Ministra Zdrowia za cykl publikacji *„Molekularne aspekty reaktywności płytek krwi”* i w roku 2006 także Nagrodę Zespołową Ministra Zdrowia za cykl publikacji *„Molekularne mechanizmy działania leków przeciwplatek”*. Habilitantka była także nagradzana przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za działalność naukową: nagrodą II stopnia w 2004 roku oraz nagrodami I stopnia w 2010, 2013 i 2015 roku.

Na uwagę zasługuje duża aktywność dr B. Luzak w dążeniu do poszerzenia swojej wiedzy i umiejętności, co potwierdzają ukończone krajowe i zagraniczne kursy zwiększające kompetencje zawodowe i umiejętności techniczne z zakresu biologii medycznej.

Ocena pracy habilitacyjnej

Rozprawa habilitacyjna dr Bogusławy Luzak to cykl 6 oryginalnych prac w języku angielskim opublikowanych w latach 2010-2016 objętych wspólnym tytułem „**Mechanizmy działania wybranych substancji modulujących funkcje płytek krwi w układach modelowych i stanach klinicznych**”. Sumaryczny IF (według JCR, zgodnie z rokiem publikacji) tych sześciu prac wynosi - 15,605; a punktacja MNiSW – 170. Dr Bogusława Luzak jest pierwszym autorem pięciu publikacji, w których udział Habilitantki (tj. myśl twórcza, organizacyjna, metodyczna, opracowanie wyników oraz przygotowanie manuskryptów) oszacowany jest na 69 %. Na uwagę zasługuje fakt, że prawie wszystkie prace badawcze zaliczone do rozprawy habilitacyjnej były przeprowadzone w kooperacji z naukowcami z innych zakładów UM w Łodzi (tj. Zakładem Biochemii Farmaceutycznej oraz Kliniką Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Medycyny Rodzinnej) jak i z zakładami innych uczelni, tj. Zakładem Biotechnologii i Nauk o Żywnieniu z Politechniki Łódzkiej, Zakładem Biochemii Ogólnej z Uniwersytetu Łódzkiego i Zakładem Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż z Przyrodniczego Uniwersytetu we Wrocławiu.

Prace badawcze stanowiące osiągnięcie naukowe można podzielić na dwa podtematy: (i) badanie mechanizmu funkcji płytek krwi i ich wrażliwość na kwas acetylosalicylowy (ASA, aspiryna) u pacjentów leczonych statynami, (ii) efekt działania ekstraktów roślinnych na funkcje płytek krwi wyizolowanych z krwi zdrowych ludzi oraz na komórki śródbłonna linii HUVEC.

Praca z roku 2011 (publikacje, poz. 1) opublikowana w Eur. J. Pharmacol. (*“The effect of a platelet cholesterol modulation on the acetylsalicylic acid-mediated blood platelet inhibition in hypercholesterolemic patients”*, IF 2,516) obejmowała analizę zmian wrażliwości płytek krwi na kwas acetylosalicylowy (ASA) u pacjentów z hipercholesterolemią, leczonych syntetyczną statyną – atorwastatyną. Analiza obejmowała pomiar uwalnianego tromboksanu B₂, wbudowywanie znakowanego ASA do białek płytek krwi, oznaczanie zmian stężenia cholesterolu jak i zmian stężenia frakcji lekkiej cholesterolu w osoczu krwi pacjentów i w płytkach krwi. Badania wykazały, że lek atorwastatyna znacząco redukuje stężenie całkowitego cholesterolu i frakcji LDL w osoczu krwi, zaś nie ma wpływu na zmianę stężenia TxB₂. Natomiast w obecności ASA obserwowano indukowanie acetylacji białek płytek krwi u pacjentów leczonych zastosowaną statyną i ten efekt był związany z obniżeniem stężenia cholesterolu w płytkach. Habilitantka na podstawie wyników badań z atorwastatyną wnioskuje, że w przypadku pacjentów o zwiększonym stężeniu cholesterolu terapia statynami zwiększa wrażliwość płytek krwi na kwas acetylosalicylowy. Ponadto, może to sugerować, że często występująca „oporność na ASA” może być wynikiem spowolnienia transportu aspiryny przez błony płytek „obciążone” cholesterolem do wnętrza komórki. Habilitantka wyraźnie podkreśla, że efekt zwiększenia wrażliwości płytek krwi na ASA w wyniku działania zastosowanej statyny korelował z obniżeniem poziomu cholesterolu w płytkach krwi, a nie ze zmianą stężenia cholesterolu całkowitego i jego frakcji lekkiej w osoczu krwi. Te wyniki są ważnym naukowym osiągnięciem i powinny być brane pod uwagę w przypadku leczenia pacjentów „opornych na aspirynę”.

Badanie mechanizmu działania statyn na zmianę wrażliwości płytek krwi na kwas acetylosalicylowy było przedmiotem kolejnej pracy pt. *„Pravastatin and simvastatin im-*

proves acetylsalicylic acid-mediated in vitro blood platelet inhibition” opublikowanej w 2012 roku w Eur. J. Clin. Invest., (publikacje, poz. 2; IF = 3,365)). Prawastatyna i simwastatyna to związki organiczne pochodzenia naturalnego. W badaniach *in vitro* obie statyny prowadziły do inhibicji aktywności płytek krwi poprzez obniżenie aktywacji receptora fibrynogenu jak i obniżenie agregacji płytek krwi a także badane statyny indukowały obniżenie kolageno-zależne generowanie tromboksanu w płytkach traktowanych aspiryną.

Wyniki badań przedstawione w dwóch pierwszych publikacjach są wartościowym i ważnym naukowym osiągnięciem ponieważ dotyczą postępowania terapeutycznego (leczenie skojarzone: statyny + kwas acetylosalicylowy) pacjentów z hipercholesterolemią, często „opornych na aspirynę”. Jak wskazują wyniki badań wysokie stężenie cholesterolu w osoczu i płytkach krwi, u pacjentów z hipercholesterolemią, koreluje z obniżoną wrażliwością płytek krwi na kwas acetylosalicylowy, zaś podanie pacjentom atorwastatyny poprawia wrażliwość na ASA. Ponadto, statyny pochodzenia naturalnego (prawastatyna i simwastatyna) jak i statyna syntetyczna (atorwastatyna) mogą (jak wykazały badania *in vitro*) modulować funkcje płytek krwi albo przez bezpośrednią interakcję z błonami płytek (choć ta interakcja nie obejmuje efektu statyn na cholesterol błon lub przepuszczalność błon) albo przez wpływ na szlaki sygnałowe np. przez wpływ na ekspresję receptora fibrynogenu i/lub acetylację białek błonowych, acetylację której mediatorem jest ASA.

Drugi podtemat rozprawy habilitacyjnej, wpisujący się w ogólnoświatowy trend badań biochemicznych, to poszukiwanie nowych i naturalnych związków posiadających właściwości ukierunkowane na regulację aktywności płytek krwi i wzmocnienie antykoagulacyjnych właściwości śródbłonna naczyniowego, a jednocześnie nie wywołujących efektów ubocznych. Habilitantka ten kierunek badań tłumaczy dynamicznym wzrostem zainteresowania związkami roślinnymi (polifenolami i ich pochodnymi) głównie z powodu ich właściwości antyoksydacyjnych, ważnych właściwości w profilaktyce chorób układu krążenia. Do badań *in vitro* z płytkami krwi izolowanymi z krwi zdrowych ludzi oraz z komórkami śródbłonna naczyniowego linii HUVEC zostały użyte następujące preparaty/ekstrakty roślinne: ekstrakt z owoców aronii, z liści czarnej porzeczki, z kwiatów górskiej arniki, z zielonych łupin orzecha włoskiego oraz z wychmielin (pozostałości po ekstrakcji szyszek chmielowych). Warsztat badawczy był obszerny i zasadny, w głównej mierze oparty na cytometrze przepływowym, w obsłudze którego Habilitantka jest specjalistką. Analiza biochemiczna obejmowała badanie wpływu preparatów roślinnych na: agregację płytek krwi, efekt cytotoksyczności wobec płytek krwi i komórek śródbłonna naczyniowego linii HUVEC (m.in. poprzez pomiar integralności błon komórek), ekspresję markerów aktywacji płytek (PAC-1 i selektyny P) oraz na modulowanie funkcji komórek śródbłonna naczyniowego poprzez badanie ekspresji białek m.in. ADPazy typu I (CD39) i syntazy eNOS. Badania biochemiczne były poprzedzone analizą chemiczną (jakościową i ilościową z użyciem HPLC) bioaktywnych związków fenolowych zawartych w testowanych ekstraktach. Bilans wyników pracy badawczej jest następujący: wszystkie testowane ekstrakty roślinne z wyjątkiem ekstraktu z liści czarnej porzeczki (podanego w stężeniu powyżej 30 µg/ml) nie wykazały efektu cytotoksycznego wobec płytek krwi jak i komórek śródbłonna. Także wszystkie ekstrakty, z wyjątkiem ekstraktu z liści czarnej porzeczki, prowadziły do zmniejszenia agregacji płytek krwi indukowanych ADP, jak i do wzrostu efektywności antypłytkowej komórek śródbłonna naczyń. Te efekty działania obserwowano przy ściśle określonych stężeniach preparatów roślinnych, najczęściej w stęże-

niach od 5 do 15 $\mu\text{g/ml}$. Na uwagę zasługuje wzrost ekspresji genów białek CD39 i eNOS w komórkach śródbłonna w przypadku zastosowania ekstraktu z liści czarnej porzeczki i ekstraktu z podchmielin. Wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach: Arch. Med. Sci. (2010; IF = 1,199), J. Physiol. Biochem. (2014, IF = 1,969, Platelets (2015, IF – 2,982) i J. Functional Foods (2016, IF = 3,574). Należy podkreślić, że dokonana ocena efektu działania bioaktywnych polifenoli obecnych w testowanych ekstraktach na płytki krwi i komórki śródbłonna naczyń jest wartościowym osiągnięciem naukowym, będącym ważną podstawą do dalszych badań. W celu urealnienia możliwości wprowadzenia testowanych roślinnych preparatów w formie suplementów i/lub leków do profilaktyki i leczenia chorób układu krążenia Habilitantka planuje kontynuować i poszerzyć zakres badań o oszacowanie biodostępności dominujących flawonoidów obecnych w testowanych ekstraktach jak i planuje przeprowadzić analogiczne badania na modelach zwierzęcych.

Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy dr Bogusławy Luzak, począwszy od 1997 roku do chwili obecnej, obejmuje 34 publikacji, w tym 25 to prace oryginalne (w 8. Pracach oryginalnych jest pierwszym autorem). Łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 47,231 i 457 punktów MNiSW. Publikacje były cytowane 286 razy, a indeks Hirscha wynosi 8 (wg Web of Science). Ponadto, wyniki prac były prezentowane w formie 55 komunikatów zjazdowych, w tym na 30 konferencjach międzynarodowych. Habilitantka jest współtwórcą 1 patentu krajowego (2007), 2 zgłoszeń patentowych (2011 i 2012), i autorem 3 recenzji publikacji dla czasopism zagranicznych.

Dr Bogusława Luzak pracę naukową rozpoczęła w Samodzielnej Pracowni Zaburzeń Krzepnięcia Krwi kierowanej przez dr hab. Cezarego Watałę, pracowni wchodzącej w strukturę Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Łodzi. W pierwszych latach działalności badawczej dr Bogusława Luzak odpowiadała za analizę aktywacji i reaktywności płytek krwi z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Badanie reaktywności płytek krwi było przedmiotem rozprawy doktorskiej przygotowywanej pod kierunkiem prof. dr hab. Cezarego Watały. Pracując w Laboratorium diagnostycznym Dr B. Luzak zajmowała się m.in. genetycznymi uwarunkowaniami choroby zakrzepowej. Dalsze losy pracy naukowej dr B. Luzak były związane z Zakładem Zaburzeń Krzepnięcia Krwi UM w Łodzi, a naukowo były związane z wyjaśnieniem roli płytek krwi i ich wrażliwości na działanie związków przeciwplateletowych m.in. kwasu acetylosalicylowego (ASA, aspiryna) u pacjentów z cukrzycą oraz były związane z badaniem funkcji płytek krwi w stanach zapalnych. W kolejnych latach badania zostały wzbogacone o preparaty roślinne zawierające polifenole, które przyczyniają się do poprawy właściwości antykoagulacyjnych śródbłonna naczyń. Na uwagę zasługuje fakt, że prace mające na celu poszukiwanie roślinnych preparatów o właściwościach antykoagulacyjnych były wykonywane we współpracy z Politechniką Łódzką i Uniwersytetem Łódzkim w ramach projektu finansowanego z funduszy strukturalnych UE, projektu pt: „Przygotowanie preparatów polifenolowych pochodzenia roślinnego o właściwościach przeciwplateletowych i kardioprotekcyjnych”. Dr B. Luzak uczestniczyła także w pracach badawczych nt polimorfizmów glikoprotein płytkowych i ich wpływu na zmiany odpowiedzi płytek na działanie związków przeciwplateletowych oraz w pracach mających na celu wyjaśnianie

przyczyn zmian miażdżycowych naczyń krwionośnych oraz genetycznych uwarunkowań funkcji płytek krwi w cukrzycy. Obecnie dr Bogusława Luzak swoje zainteresowania ukierunkowała na mikrocząsteczki pochodzenia komórkowego m.in. na mikro płytki i ich rolę w powstawaniu zmian miażdżycowych w cukrzycy oraz na opracowanie metodologii detekcji mikrocząsteczek.

Ocena dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego

Dr Bogusława Luzak, w chwili obecnej prowadzi zajęcia (wykłady i ćwiczenia z Metodologii Badań Naukowych na kierunkach: Dietetyka (studia II stopnia) i Ratownictwo Medyczne (studia I stopnia), z przedmiotu Diagnostyka Laboratoryjna na kierunku Dietetyka (studia II stopnia) i kierunku Biotechnologia (studia I stopnia). Jest promotorem przygotowywanych 3 prac magisterskich i promotorem pomocniczym doktoratu. W latach poprzednich prowadziła zajęcia także na kierunku Lekarskim z Fizjologii Klinicznej. Prowadziła także zajęcia praktyczne w ramach kursu specjalistycznego dla diagnostów laboratoryjnych pt. „*Diagnostyka laboratoryjna układu krwiotwórczego oraz układu krzepnięcia i fibrynolizy. Diagnostyka laboratoryjna wrodzonych i nabytych zaburzeń hemostazy*” (2008). Ponadto, brała udział w organizacji Warsztatów Naukowych INTER-HEMOTAZA skierowanych do młodych naukowców. Jest członkiem Zespołu ds. Zapewnienia Jakości Kształcenia dla kierunku Dietetyka na Wydziale Nauk o Zdrowiu UM w Łodzi

Podsumowując, pozytywnie oceniam wyniki pracy badawczej dr n.med. Bogusławy Luzak przedstawione w cyklu prac stanowiących rozprawę habilitacyjną, dorobek naukowy i pracę dydaktyczno-organizacyjną. Dlatego też przedkładam Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o nadanie jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych, w dyscyplinie biologia medyczna.

Kandydatka spełnia wymagania określone w art. 26 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 z późniejszymi zmianami).

Recenzent

Prof. dr hab. n.med. Krystyna Fabianowska-Majewska



Łódź, dn. 10. 06. 2016 r.