



**Ocena osiągnięcia naukowego i pozostałego dorobku**  
**dr nauk medycznych Bogusławy Luzak**  
z Zakładu Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedry Nauk Biomedycznych,  
Wydziału Nauk o Zdrowiu, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,  
w związku z postępowaniem habilitacyjnym

**Dane biograficzne Habilitantki**

Pani Bogusława Luzak ukończyła w 1997 r. studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego uzyskując tytuł magistra biologii w specjalności biofizyka. Pracę magisterską pt.: „Wpływ aklamacji i mitoksantronu oraz promieniowania laserowego niskiej mocy na modelowe komórki nowotworowe” wykonała pod kierownictwem prof. dr hab. n. biol. Zofii Józwiak. Bezpośrednio po studiach podjęła pracę w Państwowym Szpitalu klinicznym Nr I Akademii Medycznej w Łodzi na stanowisku młodszego asystenta (1997-2004 r.). W 2004 r. została zatrudniona w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, gdzie pracuje nadal na stanowisku asystenta (2004-2007 r.) i adiunkta (2007- nadal).

W 2003 r. uzyskała prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego.

Odbyła kilka kursów i szkoleń dotyczących różnych technik badawczych na uczelniach w kraju (2000-2014 r.).

Stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej nadała Jej Rada Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w 2003 r. na podstawie rozprawy doktorskiej na temat: „Rola polimorfizmu 807 C/T genu *GP1a*, podjednostki receptora dla kolagenu *GP11a*, w kształtowaniu reaktywności płytek krwi”, której promotorem był prof. dr hab. n. med. Cezary Watała, kierownik macierzystej jednostki habilitantki. Rozprawa została wyróżniona indywidualną nagrodą naukową Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

**Ocena osiągnięcia stanowiącego rozprawę habilitacyjną**

Osiągnięcie naukowe stanowiące rozprawę habilitacyjną dr Bogusławy Luzak pt. „**Mechanizmy działania wybranych substancji modulujących funkcje płytek krwi w układach modelowych i stanach klinicznych**” składa się z 6 publikacji prac oryginalnych, doświadczalnych.

Prace habilitacyjne zostały opublikowane w latach 2010-2016 i ich dane bibliograficzne są następujące:

- [1] **Luzak B.**, Boncler M., Rywaniak J., Wilk R., Stańczyk L., Czyż M., Watała C.\*: The effect of platelet cholesterol modulation on the acetylsalicylic acid-mediated blood platelet inhibition in hypercholesterolemic patients. *European Journal of Pharmacology*, 2011; 658: 91-97. (IF= 2,516)
- [2] **Luzak B.\***, Rywaniak J., Stańczyk L., Watała C.: Pravastatin and simvastatin improves acetylsalicylic acid-mediated in vitro blood platelet inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*. 2012; 42(8): 864-872. (IF= 3,365).
- [3] **Luzak B.**, Gdański J., Różalski M., Krajewska U., Olas B., Watała C.\*: Extract from *Aronia melanocarpa* fruits potentiates the inhibition of platelet aggregation in the presence of endothelial cells. *Archives of Medical Science*, 2010; 6(2): 141-144. (IF= 1,199)
- [4] **Luzak B.\***, Boncler M., Rywaniak J., Dudzińska D., Różalski M., Krajewska U., Balcerczak E., Podśędek A., Redzyna M., Watała C.: Extract from *Ribes nigrum* leaves *in vitro* activates nitric oxide synthase (eNOS) and increases CD39 expression in human endothelial cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2014; 70(4): 1007-1019. (IF= 1,969)



- [5] Rywaniak J., **Luzak B.**, Podsędek A., Dudzińska D., Różalski M., M., Watała C.\*: Comparison of cytotoxic and anti-platelet activities of polyphenolic extracts from *Arnica montana* flowers and *Juglans regia* husks. *Platelets* 2015; 26(2):168-76. (IF= 2,982)
- [6] **Luzak B.**, Golański J., Przygodzki T., Boncler M., Sosnowska D., Oszmiański J., Watała C., Różalski M.\*: Extract from spent hop (*Humulus lupulus* L.) reduces blood platelet aggregation and improves anticoagulant activity of human endothelial cells *in vitro*. *Journal of Functional Foods* 2016; 22: 259 – 269. (IF= 3,574).

Sumaryczna punktacja prac habilitacyjnych wynosi: Impact Factor=15,605, MNiSzW=170. liczba cytowań – 24.

Prace habilitacyjne zostały wykonane we współautorstwie z pracownikami z macierzystej katedry (Magdalena Boncler, Joanna Rywaniak, Lidia Stańczyk, Jacek Golański, Tomasz Przygodzki, Cezary Watała), innych jednostek Uniwersytetu Medycznego w Łodzi - Kliniki Nefrologii, Nadciśnienia i Medycyny Rodzinnej (Radosław Wilk, Jacek Rysz), Zakładu Biologii Molekularnej Raka (Małgorzata Czyż), Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej (Marek Różalski, Urszula Krajewska), Katedry Biochemii Ogólnej (Beata Olas) Pracowni Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki (Ewa Balcerzak) oraz Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej (Anna Podsędek, Dorota Sosnowska, Małgorzata Redzyna) i Katedry Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Jan Oszmiański).

Wszyscy wymienieni powyżej współautorzy przedstawili oświadczenia o ich udziale w publikacjach habilitacyjnych. Habilitantka jest pierwszym autorem w 5 publikacjach i autorem podejmującym korespondencję w 2 publikacjach. Z analizy tej wynika, że Habilitantka ma zdecydowanie dominujący udział w wymienionych powyżej publikacjach, stanowiący odpowiednio: 70%, 85%, 60%, 70%, 30% i 60%.

Prace habilitacyjne stanowią monotematyczny cykl publikacji na temat wpływu na działanie przeciwplateletowe w odniesieniu do płytek krwi ludzkiej oraz ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego (HUVEC) (modelowe komórki izolowane z krwi pępowinowej) kwasu acetylosalicylowego wespół ze statynami oraz ekstraktów z kilku znanych roślinnych surowców leczniczych z oznaczoną zawartością fenoli całkowitych oraz klas tych fenoli, a w jednym przypadku nawet poszczególnych związków fenolowych.

**W pierwszej pracy** habilitacyjnej, w nawiązaniu do znanej „oporności na aspirynę”, tj. zmniejszonego jej działania przeciwplateletowego u pacjentów z hypercholesterolemią, badano wpływ 1-, 3- i 6-miesięcznej terapii statyną - atorwastatiną na wrażliwość płytek krwi na działanie aspiryny w warunkach *in vitro*. Inkorporację aspiryny (kwas acetylosalicylowy) do białek płytek mierzono poziomem inkorporacji rodnika [<sup>14</sup>C]acetylowego stosując znakowaną [<sup>14</sup>C]aspirynę i wcześniej opublikowaną metodę [Watała et al. 2005].

Stwierdzono u większości pacjentów zwiększenie wrażliwości płytek na działanie aspiryny – zmniejszenie stężenia tromboksanu B2 oraz znaczne zwiększenie acetylacji białek płytek, korelujące z obniżeniem poziomu cholesterolu w płytkach krwi, ale niezależne od obniżenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, czy stężenia oksydowanego LDL w osoczu.

**W drugiej pracy** habilitacyjnej, kontynuując wątek z publikacji pierwszej, badano wpływ *in vitro* preinkubacji krwi pełnej trzema statynami – prawastatiną, simwastatiną lub atorwastatiną w obecności kwasu acetylosalicylowego (ASA), na indukowaną ADP lub kolagenem agregację płytek krwi. Mierzono agregację płytek, ekspresję CD36 (powierzchniowa ekto-ADPaza typu I degradująca ADP - potencjalnego aktywatora płytek), PAC-1 (aktywowana forma receptora fibrynogenu) i CD62 (selektyna P) płytek oraz generację tromboksanu.

Stwierdzono, że w obecności ASA (50 μM), simwastatyna i prawastatyna znacznie obniżyły agregację płytek (20% i 20%), ekspresję PAC-1 (30% i 15%), i generację tromboksanu (35% i 30%), w porównaniu z samą ASA. W sumie, simwastatyna i prawastatyna poprawiały działanie przeciwplateletowe ASA.

**W trzeciej pracy** habilitacyjnej komercyjny ekstrakt z owoców aronii czarnej [*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott], zawierający ok. 60% fenoli całkowitych, w tym co najmniej 20% antocyjanów, badano na agregację płytek krwi w obecności ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego (HUVEC).



Stwierdzono, że ekstrakt ten istotnie poprawiał działanie antyagregacyjne komórek śródbłonka w stężeniu 5 µg/ml, ale efekt ten nie zwiększał się w wyższych stężeniach ekstraktu.

**W czwartej pracy** habilitacyjnej badano działanie przeciwplatek ekstrakty z wysuszonych liści porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.), a ściślej frakcję wodną otrzymaną przez ekstrakcję ciecz-ciecz woda-chloroform zagęszczonego ekstraktu acetonowo-wodnego (70% aceton). We frakcji tej oznaczono zawartość: fenoli całkowitych w przeliczeniu na kwas galusowy (metodą Folin-Ciocalteu), flawan-3-oli całkowitych w przeliczeniu na (+)-katechinę (metodą Swain et Hillis), proantocyjanidyn w przeliczeniu na cyjanidynę (metodą Rösch et al.), garbników hydrolizujących w przeliczeniu na galusan metylu i kwas elagowy (metodą HPLC po hydrolizie), flawonoli w przeliczeniu na kwercetynę (metodą HPLC po hydrolizie), kwasów hydroksycynamonowych w przeliczeniu na kwas chlorogenowy, jak również oznaczono aktywność antyoksydacyjną tej frakcji trzema metodami – zmiatania wolnych rodników ABTS i DPPH oraz zdolnością redukcji jonów żelaza (FRAP) - w każdym przypadku wyrażaną w równoważnikach (ekwiwalentach) Troloxu (TEAC).

Stwierdzono, że ekstrakt zwiększał ekspresję CD39 oraz aktywację syntazy tlenu azotu (eNOS), co poprawia właściwości przeciwplatek komórek śródbłonka naczyniowego (HUVEC), ale nie zwiększał hamującego działania HUVEC na reaktywność płytek krwi. Ponadto zaobserwowano, że ekstrakt w niskich stężeniach (0.01-2,5 µg/ml) zwiększał żywotność HUVEC (do 30%), ale w wyższych stężeniach zmniejszał tę żywotność lub wręcz działał toksycznie (100 µg/ml). Wynikła z tego ogólna dyrektywa konieczności oceny cytotoksyczności preparatów fenolowych przed monitorowaniem ich działania biologicznego.

**W piątej pracy** habilitacyjnej badano ekstrakty, a ściślej frakcje wodne ekstraktów acetonowo-wodnych (70% aceton) przygotowane odrębnie z wysuszonych kwiatów (ściślej kwiatostanów - koszyczków) arniki górskiej (*Arnica montana* L.) oraz wysuszonych zewnętrznych części owocni (egzokarpium + mezokarpium) orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.) – w pracy określanych jako łuski (ang. *husks*). W ekstraktach tych oznaczono (jak w pracy czwartej) zawartość fenoli całkowitych, flawan-3-oli, kwasów hydroksybenzoesowych, kwasów hydroksycynamonowych, flawonoli oraz aktywność antyoksydacyjną – metodami ABTS oraz FRAP.

Stwierdzono brak toksyczności tych ekstraktów stosując dwa oznaczenia – cytofluorometrię z wybarwianiem kalceiną, jako znacznikiem fluorescencyjnym, oraz pomiar uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Stwierdzono również, że ekstrakty te, szczególnie ekstrakt z *A. montana*, znacząco obniżały indukowaną ADP agregację płytek krwi i zmniejszały indeks ich reaktywności (PRI).

**W szóstej pracy** habilitacyjnej badano wpływ na funkcje ludzkich komórek śródbłonka (HUVEC) oraz płytek krwi od zdrowych dawców i pacjentów z wielonaczyniową chorobą wieńcową zażywających aspirynę, oczyszczony (jak w pracach powyżej) ekstrakt acetonowo-wodny (70% aceton) z szyszek (owocostanów) chmielu (*Humulus lupulus* L.) pozostałych po ekstrakcji nadkrytycznej CO<sub>2</sub>. W ekstrakcie oznaczono zawartość fenoli całkowitych, jak również (metodą UPLC-PDA, na kolumnie RP-18, ziarno 1,7 µm) flawan-3-oli (przy λ=280 nm), kwasów hydroksycynamonowych (przy λ=320 nm) i glikozydów flawonoli (przy λ=360 nm), wśród których zidentyfikowano 26 związków fenolowych metodą UPLC-PDA-MS/MS na podstawie widm UV, czasów retencji (w przypadku związków wzorcowych), mas cząsteczkowych i fragmentacji ESI-MS w trybie jonów ujemnych.

Stwierdzono, że ekstrakt hamował indukowaną ADP agregację płytek krwi w 11% i 23% w stężeniach 7,5 i 15 µg/ml oraz, że poprawiał antykoagulacyjne właściwości HUVEC w stężeniach 1 i 6 µg/ml. Zwiększał on aktywację CD39 i aktywność syntazy NO (eNOS), ale też hamował ekspresję genu eNOS. Ponadto, ekstrakt zwiększał przeżywalność szczurów z eksperymentalną cukrzycą, ale w dawkach niższych niż 10 mg/kg (2,5 i 5 mg/kg).

**W podsumowaniu oceny osiągnięcia naukowego stanowiącego pracę habilitacyjną** dr Bogusławy Luzak, stwierdzam, że stanowi ono znaczny wkład w rozwój nauk medycznych, zwłaszcza w zakresie poszukiwania substancji pochodzenia naturalnego o działaniu przeciwplatekowym, nie wykazujących przy tym działania cytotoksycznego.

W przeprowadzonych badaniach doświadczalnych wykazano, że oczyszczone, bogate w związki fenolowe (polifenole) należące do różnych klas chemicznych, ekstrakty o oznaczonej zawartości tych związków - z owoców aronii czarnej (*Aronia melanocarpa*), liści porzeczki czarnej (*Ribes nigrum*), kwiatostanów arniki górskiej (*Arnica montana*), owocni (zewnętrznej i środkowej) orzecha włoskiego (*Juglans regia*) oraz, pozostałych po ekstrakcji nadkrytycznej, owocostanów (szyszek) chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus*), wykazują działanie na płytki krwi ludzkiej oraz modelowe komórki nabłonka naczyniowego (HUVEC).



Badany w dwóch pierwszych z wymienionych prac habilitacyjnych kwas acetylosalicylowy (aspiryna, ASA) jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwplatek i, jako związek fenolowy – pochodna kwasu hydroksybenzoesowego, jest odpowiednim odniesieniem do fenoli roślinnych, pomimo, że jego mechanizm działania wynika z obecności grupy acetylowej, rzadko spotykanej wśród pochodnych fenolowych roślinnych.

Należy podkreślić bardzo trafny wybór metody przygotowania ekstraktów do badań. Uwodniony – 70% aceton jest najbardziej odpowiednim ekstrahentem fenoli roślinnych, zwłaszcza proantocyjanidyn, a późniejsze przemywanie chloroformem rozpuszczonego w wodzie zagęszczonego ekstraktu zapewniło usunięcie trudno rozpuszczalnych w wodzie składników - głównie chlorofilu i innych lipofilnych związków. Należy zauważyć pewien zbieg okoliczności - mianowicie, że przemywanie chloroformem prowadziło do usunięcia z ekstraktów również innych metabolitów wtórnych, skądinąd uważanych za główne ciała czynne, które mogłyby silnie wpłynąć na wyniki badań biologicznych. W przypadku *Arnica montana* są to laktony seskwiterpenowe (np. helenalina) o znanym działaniu przeciwplatekowym. W przypadku *Juglans regia* jest to juglon (5-hydroksy-1,4-naftalenodion; 5-hydroksy-1,4-naftochonon), który jest związkiem fenolowym, ale jako naftochinon mógłby wykazać działanie cytotoksyczne. W badaniach habilitantki wyciąg z *J.regia* pozbawiony juglonu okazał się nietoksyczny dla badanych komórek.

Innym bardzo trafnym posunięciem było badanie ekstraktów w stężeniach wyrażanych w ekwiwalentach kwasu galusowego (GAE) wynikających z oznaczenia fenoli całkowitych. Było to najbardziej racjonalne rozwiązanie pozwalające na jednolite traktowanie różnych ekstraktów o zróżnicowanym składzie poszczególnych składników.

W sumie, w pracach habilitacyjnych w przekonujący sposób wykazano, że przeciwplatekowe działanie wybranych i odpowiednio przygotowanych ekstraktów roślinnych wynika z obecności w nich związków fenolowych.

Ważnym osiągnięciem było też udowodnienie, że przed badaniem działania przeciwplatekowego określonego czynnika, należy sprawdzić odpowiednimi metodami jego wpływ na żywotność komórek krwi czy śródbłonna naczyniowego.

Wyniki prac habilitacyjnych mają też wymiar praktyczny – wskazują na rośliny, które mogą być alternatywą dla kwasu acetylosalicylowego (aspiryny) w zapobieganiu chorobom układu krążenia.

Wszystkie prace habilitacyjne zostały opublikowane w czasopiśmie o obiegu światowym, posiadającym wskaźnik Impact Factor, a Habilitantka jest ich wiodącym współautorem.

## Ocena dorobku naukowego ogólnego i pozahabilitacyjnego

**Całkowity dorobek naukowy dr Bogusławy Luzak** stanowi **25** publikacji oryginalnych (w tym **22** z Impact Factor), **9** publikacji przeglądowych (w tym 1 z IF), **55** komunikatów zjazdowych (w tym 30 międzynarodowych). Ponadto ma w dorobku 1 patent i 2 zgłoszenia patentowe.

Punktacja tego dorobku wynosi: **IF = 47,231** (w tym IF = 46,202 za prace oryginalne i IF=1,029 za pracę przeglądową); MNiSW = 457; łącznie 286 cytowań, indeks Hirscha - 8 (wg Web of Science) - 9 (wg Scopus); 358 cytowań.

Prace oryginalne w dorobku pozahabilitacyjnym (19 publikacji) opublikowane zostały w czasopiśmie z Impact Factor (16 publikacji), takich jak: International Journal of Cardiology (1,164), Platelets (0,778; 2,627; 2,982), European Journal of Haematology (1,672), Cytometry (1,933), Thrombosis Research (1,710; 1,541; 2,038), Acta Biochimica Polonica (0,629), Journal of Biomedical Science (1,937), Cell Biology International (1,363), Pharmacological Reports (2,086), Thrombosis and Haemostasis (5,439), Advances in Medical Sciences (1,105).

W dorobku pozahabilitacyjnym dr Bogusława Luzak jest 4 razy pierwszym i 4 razy drugim autorem w publikacjach oryginalnych, 4 razy pierwszym autorem w pracach poglądowych, co wskazuje na jej dominujący udział w znacznej części dorobku pozahabilitacyjnego.

Tematyka tych prac dotyczy badań eksperymentalnych różnych aspektów funkcji płytek krwi. Wkład habilitantki w publikacjach oryginalnych polegał na wykonaniu oznaczeń aktywacji i reaktywności płytek krwi metodą cytometrii przepływowej, wykonaniu genotypowania polimorfizmu, oznaczeń aktywacji i adhezji; bardzo często też na opracowaniu planu badania i przygotowaniu manuskryptu.

Dr Bogusława Luzak była kierownikiem 2 grantów KBN (1999, 2001 r.), 1 grantu NCN własnego (2008-2011 r.), 1 tematu własnego UMED (2010 r.), kierownikiem zadania badawczego (2009-2013 r.) i konsultantem (2010-2015 r.) w 2 grantach wysokobudżetowych UE oraz wykonawcą 8 grantów KBN/NCN.



Recenzowała 3 manuskrypty dla czasopism zagranicznych.  
Jest promotorem pomocniczym pracy doktorskiej (mgr Dominika Dudzińska), której promotorem jest prof. dr hab. Cezary Watała.

Dorobek naukowy dr Bogusławy Luzak, jest bardzo duży, zarówno pod względem merytorycznym, jak i bibliometrycznym.

### Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Działalność dydaktyczna dr Bogusławy Luzak dotyczy prowadzenia zajęć dla studentów na 3 kierunkach: na kierunku dietetyka (studia II<sup>o</sup>) z przedmiotu *metodologia badań* (wykłady, ćwiczenia, zaliczenie) oraz z przedmiotu *Diagnostyka laboratoryjna* (ćwiczenia); na kierunku ratownictwo medyczne (Ist) z przedmiotu *Metodologia poznania naukowego* (wykłady, ćwiczenia, zaliczenie); na kierunku biotechnologia (I stopnia) *Wprowadzenie do diagnostyki laboratoryjnej* (ćwiczenia).

Była kierownikiem 3 i recenzentem 2 prac magisterskich.

Brała udział w organizacji Warsztatów Naukowych INTERHEMOTAZA dla młodych badaczy (1998-2004 r.). Jest członkiem Zespołu ds. Zapewnienia Jakości Kształcenia dla kierunku dietetyka na Wydziale Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (2015 – nadal).

Dr Bogusława Luzak prowadzi z dużym zaangażowaniem zajęcia dydaktyczne, co zostało docenione przez fakt włączenia Jej do Zespołu ds. Zapewnienia Jakości Kształcenia.

Dr Bogusława Luzak została nagrodzona za osiągnięcia naukowe 2 Nagrodami Zespołowymi Ministra Zdrowia (2003, 2015 r.) oraz 4 nagrodami Rektora UM w Łodzi – II stopnia (2004 r.) i I stopnia (2010, 2013, 2015 r.).

### Podsumowanie i wniosek

Podsumowując moją ocenę osiągnięcia naukowego stanowiącego pracę habilitacyjną oraz pozostałego dorobku dr n. med. Bogusławy Luzak stwierdzam, że Kandydatka w pełni spełnia kryteria oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami Dz.U. z 2014 r. poz. 1852 ze zm. Dz.U. z 2015 r. poz. 249).

Wnioskuje zatem o nadanie dr n. med. Bogusławie Luzak stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauki medycznej w dyscyplinie biologia medyczna.

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej

i Biotechnologii Roślin

  
prof. dr hab. Jaromir Budzianowski

prof. dr hab. n. farm. Jaromir Budzianowski

Poznań, 19 maja 2016 r.