

## **AUTOREFERAT**

### **1. Imię i nazwisko**

Hanna Lewandowska-Siwkiewicz

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.**

- Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej z dnia 23.02.2006. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Powstawanie, struktura i przemiany dinitrozylowych kompleksów żelaza w modelowych układach biologicznych”. Promotorem w przewodzie doktorskim był prof. dr hab. Marcin Kruszewski (Zakład Naukowy – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej), a recenzentami: Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz (Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego) oraz Prof. dr hab. Lidia Gębicka (Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej).
- Tytuł magistra chemii uzyskany na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; 11.06.2001. Tytuł pracy magisterskiej: „Synteza i badanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych kompleksów diaminocukrowych Pd i Pt”. Promotorem pracy była Prof. dr hab. Krystyna Maria Anna Samochocka (Zakład Fizyki i Radiochemii, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego). Opiekunem pracy był Prof. W. Priebe (MD Anderson Cancer Center).

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

- 2001-2006: asystent w Zakładzie Naukowym – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej
- 10 01 2006 - 01 11 2008 urlop macierzyński/wychowawczy
- 2008-2010: adiunkt w Zakładzie Naukowym – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej
- 27 03 2010 - 27 03 2013 urlop macierzyński/wychowawczy
- 2013-obecnie: adiunkt w Zakładzie Naukowym – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

**Dinitrozyłowe kompleksy żelaza – synteza, struktura i biologia.**

b) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy.

Na dzieło składa się 8 publikacji wymienionych w tabeli 1.:

Tabela 1. Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

**A Lewandowska H, Męczyńska S, Sochanowicz B, Sadło J, Kruszewski M. Crucial role of lysosomal iron in the formation of dinitrosyl iron complexes *in vivo*. J Biol Inorg Chem. 2007;12(3):345–52.**

**B Lewandowska H, Kalinowska M, Brzóska K, Wójciuk K, Wójciuk G, Kruszewski M. Nitrosyl iron complexes—synthesis, structure and biology. Dalton Trans. 2011;40(33):8273–89.**

**C Lewandowska H, Stępkowski TM, Sadło J, Wójciuk GP, Wójciuk KE, Rodger A, Kruszewski M. Coordination of iron ions in the form of histidinyl dinitrosyl complexes does not prevent their genotoxicity. Bioorg Med Chem. 2012;20(22):6732–8.**

**D Lewandowska H. Spectroscopic Characterization of Nitrosyl Complexes. Struct Bond. 2014;153:115–66.**

**E Lewandowska H. Coordination Chemistry of Nitrosyls and Its Biochemical Implications. Struct Bond. 2014;153:45–114.**

**F Lewandowska H, Sadło J, Męczyńska S, Stępkowski TM, Wójciuk G, Kruszewski M. Formation of glutathionyl dinitrosyl iron complexes protects against iron genotoxicity. Dalton Trans. 2015;44(28):12640–52.**

**G Lewandowska H, Męczyńska-Wielgosz S, Sikorska K, Sadło J, Dudek J, Kruszewski M. LDL dinitrosyl iron complex: A new transferrin-independent route for iron delivery in hepatocytes. BioFactors. 2018;44(2):192–201.**

**H Lewandowska H, Stępkowski TM, Męczyńska-Wielgosz S, Sikorska K, Sadło J, Dudek J, Kruszewski M. LDL dinitrosyl iron complex acts as an iron donor in mouse macrophages. J Inorg Biochem. 2018;188:29–37.**

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – **24.164**

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – **295**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **78**

## c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Odnośniki do prac wchodzących w skład rozprawy oznaczono w tekście dużymi literami alfabetu w nawiasach kwadratowych, według tabeli 1.

### Wprowadzenie

Dinitrozyłowe kompleksy żelaza stanowią jedną z aktywnych form, w jakiej występuje tlenek azotu (II), NO, biologiczna cząsteczka sygnalizacyjna. NO jest kluczowym bioprzekaźnikiem u kręgowców, odgrywającym rolę w różnych procesach [1]. Jest to znany bioprodukt w prawie wszystkich typach organizmów, od bakterii po rośliny, grzyby i komórki zwierzęce. Tlenek azotu(II) (NO) został zidentyfikowany jako śródbłonkowy czynnik relaksujący (EDRF — ang. endothelium-derived relaxing factor) czyli substancja odpowiedzialna za rozszerzanie mięśni gładkich naczyń krwionośnych i w efekcie regulująca ciśnienie krwi. Tlenek azotu (II) i jego kompleksy pośredniczą także w przewodzeniu sygnałów nerwowych, regulacji odpowiedzi immunologicznej i apoptozy [2]. Z uwagi na swój wolnorodnikowy charakter, NO jest jednocześnie silnie szkodliwy dla składników komórki. Przyjmuje się, że fizjologiczne stężenia NO osiągają kilka nanomoli, a stężenia obserwowane w stanach patologicznych (zapalenie) sięgają mikromoli [3]. Nadprodukcja NO często towarzyszy występowaniu chorób neurodegeneracyjnych [4, 5]. Ze względu na wysoki współczynnik dyfuzji i rodnikowy charakter, NO jest w środowisku komórkowym cząsteczką o krótkim czasie półtrwania. Za stabilną formę NO obok nitrozotioili uznawane są właśnie nitrozyłowe kompleksy żelaza, w których powinowactwo NO do atomów żelaza skutkuje mocno zdelokalizowanym układem elektronowym na grupie Fe-N-O. To z kolei pozwala na zachowanie formy wolnorodnikowej, jednocześnie chroniąc komórki przed niebezpiecznymi skutkami działania rodnika.

Wśród możliwych nitrozyłowych kompleksów żelaza obserwowanych w układach biologicznych najbardziej powszechnie spotykane są mononitrozyłowe kompleksy z porfirynami, mono- i dinitrozyłowe kompleksy z centrami siarkowo-żelazowymi białek oraz niespecyficznie związane dinitrozyłowe kompleksy białkowe. Jednocentrowe kompleksy dinitrozyłowe (DNIC) dają się łatwo obserwować w tkankach za pomocą spektroskopii rezonansu magnetycznego (EPR), dzięki swojej paramagnetycznej naturze. Ostatnio istnieje coraz więcej danych na temat funkcji regulatorowych (przegląd w pracach [B] i [E]).

W DNIC atom centralny, zgodnie z notacją Enemarka i Felthama [6] będący jodem żelaza na formalnym stopniu utlenienia określanym jako +1, jest związany w pierwszej strefie koordynacji z dwiema cząsteczkami NO i najczęściej dwoma innymi ligandami, które koordynują przez grupę tiolanową, aminową, iminową lub karboksylową. Badania DNIC techniką EPR pozwoliły na określenie struktury przestrzennej tych kompleksów w roztworach

wodnych i niejednokrotnie sugerowały występowanie w pierwszej sferze koordynacyjnej dodatkowych ligandów (np. wody). Formy krystaliczne uzyskane z rozpuszczalników niepolarnych na ogół nie mają charakteru rodnikowego. Ilościowa charakterystyka cech spektralnych małej grupy atomów tworzących rdzeń reaktywnego centrum może oświetlić mechanizmy działania i regulacji złożonych biocząsteczek. Dlatego poza badaniem enzymów zawierających hemowe i niehemowe centra żelazowe, tworzenie nitrozylowych kompleksów z tymi centrami pomaga w wyjaśnianiu zmian zachodzących w strukturze wielu biologicznych ligandów.

Odnosnie struktury elektronowej rdzenia  $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$  obecnego w DNIC, znane stabilne DNIC można podzielić na trzy grupy: paramagnetyczne jednojądrzaste  $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$  DNIC, dimeryczne formy  $[[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9]_2$ , które są diamagnetyczne ze względu na parowanie elektronów oraz diamagnetyczne  $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^{10}$  DNIC. Skład DNIC zmienia się w zależności od warunków, w jakich się tworzą. Ligandy zawarte w kompleksach typu  $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^9$  obserwowanych w materiałach biologicznych to (i) grupy tiolanowe aminokwasów (ii) nieorganiczne atomy siarki w centrach żelazowo-siarkowych, (iii) pierścienie imidazolowe obecne np. w histydynie i purynach, (iv) pierścienie pirolowe porfiryn [7, 8]. Diamagnetyczne centra  $[\text{Fe}(\text{NO})_2]^{10}$  DNIC są natomiast koordynowane przez ligandy zawierające CO, PPh<sub>3</sub> i N [9]. Paramagnetyczne DNIC zostały odkryte jako pierwsze znane kompleksy tlenku azotu naturalnie występujące w żywych organizmach na długo przed rozpoznaniem potencjału tlenku azotu w bioregulacji [1].

DNIC powstają w organizmach żywych w warunkach fizjologicznych i patologicznych związanych ze stanem zapalnym, reperfuzyją po niedokrwieniu, chorobami układu nerwowego (np. chorobą Parkinsona), nowotworami czy zespołem odrzucenia przeszczepu. Powstawanie DNIC związane jest z intensywną produkcją tlenku azotu przez makrofagi, komórki nerwowe, śródbłonek, komórki Langerhansa lub hepatocyty [10].

DNIC są ważnym czynnikiem w procesach komórkowych zależnych od NO (przeгляд w pracy [B], [E]). W przypadku śmierci komórkowej wywołanej za pośrednictwem NO tworzenie DNIC może osłabić cytotoksyczność NO [11]. Tworzenie DNIC może odgrywać rolę ochronną ze względu na ich wyższą stabilność niż w przypadku NO [12]. Denninger i in. odkryli, że tworzenie DNIC zmniejsza komórkową pulę labilnego żelaza (labile iron pool, LIP), zdefiniowaną jako pula słabo chelatowanego żelaza w postaci kompleksów o niskiej masie cząsteczkowej, przez co komórka jest mniej podatna na stres oksydacyjny [13]. W kilku pracach można spotkać opinię, że LIP jest docelowym miejscem wiązania większości pojawiających się w komórce rodników NO [14–16]. Te doniesienia implikują rolę DNIC w komórkowych mechanizmach ochrony przed wzrostem puli labilnego żelaza podczas stanu zapalnego. Oprócz pozytywnej roli regulatorowej opisanej powyżej, DNIC są również znane ze swoich toksycznych efektów [17]. W szczególności diglutationylowy DNIC jest silnym i nieodwracalnym inhibitorem reduktazy glutationowej [18, 19].

## Motywacja do podjęcia badań

---

Celem prac wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego było lepsze poznanie znaczenia roli dinitrozylowych kompleksów żelaza w układach biologicznych oraz próba znalezienia praktycznych zastosowań uzyskanej wiedzy. W roku 2006 obecność paramagnetycznych dinitrozylowych kompleksów żelaza, szczególnie w warunkach stanu zapalnego w organizmie była już dobrze znana i zaobserwowana, jednak **pozostawało szereg pytań dotyczących pochodzenia i natury DNIC w układach biologicznych, ich stabilności, struktury oraz funkcji regulatorowych. Do wyjaśnienia pozostawały następujące zagadnienia:**

- Jakie jest pochodzenie jonów żelaza biorących udział w tworzeniu DNIC w układach biologicznych. Ze względu na niezwykle właściwości oksydoredukcyjne, żelazo jest nazywane pierwiastkiem życia [20]. Odgrywa istotną rolę w katalizie reakcji enzymatycznych, które obejmują transfer elektronu. Potencjał oksydoredukcyjny żelaza ulega silnej modulacji pod wpływem pola ligandów. Z uwagi na właściwości oksydoredukcyjne, metabolizm żelaza w komórce podlega bardzo ścisłej kontroli. Praktycznie całe komórkowe żelazo jest związane z białkami. Przechowywane w formie związanej z ferrytyną, ulega uwolnieniu w lizosomach w celu natychmiastowego kontrolowanego włączenia do centrów aktywnych białek. Jednak, ponieważ proces włączania żelaza w obręb centrów zachodzi w różnych przedziałach komórkowych (np. ferrochelataza włącza żelazo do hemu w mitochondriach), w komórce jest dostępna pewna pula żelaza słabo związanego z niskocząsteczkowymi ligandami, określana jako 'pula labilnego żelaza' (labile iron pool, LIP). Odpowiedzi wymagało pytanie, w jakim stopniu w tworzeniu DNIC uczestniczy cytozolowa LIP, w jakim żelazo uwalniane z ferrytyny w lizosomach a w jakim pula żelaza pochodzącego z centrów żelazowo-siarkowych bądź porfirynowych.
- Pytanie o naturę ligandów biorących udział w tworzeniu biologicznych DNIC: Kwestią nierozstrzygniętą było czy są to ligandy o niskiej masie cząsteczkowej, jak szereg polipeptydów obecnych w komórkach (m. inn. glutation, karnozyna, anseryna, angiotensyna), czy głównym celem tworzenia DNIC są atomy centrów aktywnych białek oraz ligandy wchodzące w skład strefy koordynacyjnej metalu w tych centrach, czy też za wzrost poziomu DNIC pod wpływem działania NO odpowiadają reakcje niespecyficznego łączenia się jonu centralnego z dwiema grupami NO i przypadkowymi resztami komórkowych białek.
- Za pomocą jakich grup funkcyjnych wyżej wymienione ligandy wchodzą do strefy koordynacyjnej DNIC i w jakim stopniu charakter chemiczny utworzonych kompleksów zależy od rodzaju ugrupowania wchodzącego w skład strefy koordynacyjnej. Pośród głównych donorów elektronowych typowanych jako te, które mogą tworzyć DNIC w komórkach uważano atomy siarki grup tiolanowych [21] oraz atomy azotu pierścieni imidazolowych [22]. Oba te ugrupowania, dostępne w aminokwasach występują zarówno w białkach, małych peptydach, jak i w strefach koordynacyjnych centrów aktywnych.

Spodziewano się, że stabilność i zdolność regulatorowa powstających DNIC będzie w dużym stopniu zależała od otoczenia jonu centralnego.

- Jakże jeszcze inne funkcje, oprócz poznanej funkcji przenośnika tlenu azotu, mogą posiadać dinitrozyłowe kompleksy żelaza w komórkach, oraz czy tworzenie DNIC może być wykorzystane w terapii do modulacji procesów zależnych od jonów żelaza i tlenu azotu (II).

**Podczas realizacji mojego osiągnięcia naukowego odniosłam się do powyższych zagadnień a uzyskane przeze mnie wyniki pozwoliły na udzielenie szeregu odpowiedzi. Najważniejsze wnioski wynikające z niniejszego osiągnięcia zostały przedstawione w podsumowaniu.**

## Metodologia

---

Podczas wykonywania badań zastosowałam szerokie spektrum metod, poczynając od metod fizykochemicznych poprzez biochemiczne do biologicznych. Wśród zastosowanych metod są niżej wymienione:

- Spektroskopia UV/VIS, EPR, IR, dichroizmu kołowego (CD), korelacji fotonów (DLS), spektrofluorymetria,
- Atomowa spektrometria absorpcyjna,
- Spektrometria masowa (MALDI),
- Metody biologii molekularnej (RT-PCR),
- Metody cytologiczne (MTT),
- Test cięcia DNA plazmidowego,
- Metody biochemiczne (frakcjonowanie białek, organelli)

Zastosowanie szerokiego spektrum metod pozwoliło mi na powiązanie zagadnień dotyczących struktury DNIC z ich oddziaływaniami w układach biologicznych.

## Streszczenie osiągnięcia naukowego

---

DNIC o małej masie cząsteczkowej mogą służyć jako nośniki NO [23] i ich pojawianie się jest związane z produkcją NO w licznych układach biologicznych [10]. Wykazano także, że DNIC katalizują proces S-nitrozylacji białek [24, 25]. W żywych komórkach prawdopodobnym źródłem żelaza do tworzenia DNIC są białka żelazowe i/lub LIP, która stanowi punkt stykowy dla procesów wewnątrzkomórkowego obrotu żelaza. Najprawdopodobniej LIP składa się z obu postaci żelaza jonowego ( $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ ) związanego z wieloma ligandami o niskim powinowactwie do jonów żelaza. Pomimo swojej tajemniczej natury, LIP jest ważną pulą żelaza komórkowego, biorącą udział w różnych procesach

fizjologicznych (przegląd w [26]). Już w roku 2006 (rok realizacji pracy [A]) istniały przesłanki, że lizosomy są ważnym źródłem komórkowego LIP oraz że lizosomalny LIP jest ważnym efektem uszkodzeń generowanych podczas stresu oksydacyjnego [27]. Lizosomy są organellami, które rozkładają makromolekuły pochodzące z przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub z wnętrza komórki i są odpowiedzialne za normalny obrót organelli i dużych białek, takich jak ferrytyna [28–30]. Żelazo pochodzące z lizosomu było postulowane jako konieczne do indukowanego przez nadtlenek wodoru efektu cytotoksycznego [31], uszkodzeń DNA i apoptozy [32]. Sugerowano, że destabilizacja lizosomowa jest ważnym czynnikiem w indukowanej promieniowaniem śmierci komórkowej wynikającej z degradacji białek żelazowych i jednoczesnego działania reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species, ROS) [33]. Zatem żelazo lizosomalne może również uczestniczyć w tworzeniu DNIC w żywych komórkach.

Aby przetestować tę hipotezę, w pracy [A] użyłam dwóch żelazowych chelatorów: salicylaldehydu, izonikotynoilohydrazonu (SIH), chelatora żelaza, który łatwo przenika wszystkie przedziały komórkowe [34] i mesylanu desferrioksaminy (DFO), który jest pobierany głównie przez endocytozę i lokalizuje się prawie wyłącznie w obrębie przedziału lizosomalnego [35, 36]. Tworzenie DNIC rejestrowano przy użyciu elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Oba czynniki chelatujące zahamowały tworzenie DNIC do 50% po 6 godzinach traktowania. **Wyraźne zahamowanie tworzenia DNIC pod wpływem działania DFO udowadnia kluczową rolę żelaza lizosomalnego w tworzeniu wewnątrzkomórkowych DNIC.**

Aby dokładniej zbadać rolę żelaza lizosomalnego w tworzeniu DNIC, zapobieżono proteolizie lizosomalnej przez wstępne traktowanie całych komórek  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Traktowanie za pomocą  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hamowało tworzenie DNIC w sposób zależny od czasu, co wskazuje na znaczenie degradacji białek żelazowych w tworzeniu DNIC *in vivo*. **Podsumowując, praca [A] dostarczyła dowodów, że żelazo lizosomalne odgrywa kluczową rolę w tworzeniu DNIC w warunkach *in vivo*. Degradacja metaloprotein zawierających żelazo jest ważna dla tego procesu.**

Właściwości strukturalne i spektroskopowe w zestawieniu z obliczeniami teoretycznymi pozwalają na odpowiednie przypisanie struktury elektronowej grupy MNO. Niemniej jednak należy zachować ostrożność przy interpretacji tych wyników (tj. przy przypisywaniu konkretnych stanów utlenienia metalowi i ligandowi NO), ze względu na zdelokalizowany charakter gęstości elektronowej. Wśród metod spektroskopowych, które są najbardziej przydatne w badaniu kompleksów nitrozylowych, są te stosowane tradycyjnie w badaniach strukturalnych, tj. IR, EPR, UV-Vis, rezonansowy Raman, ale także bardziej specyficzne, takie jak spektroskopia Mössbauera [37], absorpcja rentgenowska (XAS) [38], magnetyczny dichroizm kołowy (CD) [39] i spektroskopia rezonansu paramagnetycznego (EPR), pomiary wrażliwości magnetycznej i obrazowanie metodą rezonansu paramagnetycznego dla systemów biologicznych [40]. Zaawansowane obliczenia teoretyczne są obecnie niezbędne przy interpretacji wyników pomiarów spektroskopowych. **W przeglądzie [D] (artykuł na zaproszenie) przedstawiłam podsumowanie wyników uzyskanych do chwili obecnej za pomocą najbardziej powszechnych metod badania**

**nitrozylowych kompleksów metali. Wyszczególniłam i omówiłam kwestie, które można rozwiązać za pomocą tych metod.**

Wykazano, że DNIC o niskiej masie cząsteczkowej powodują dwa typy nitrozylacynnych modyfikacji białek, tworząc albo S-nitrozotiole białek, albo związane z białkiem DNIC [41]. Jak wspomniano DNIC uczestniczą jako związki pośrednie w katalizowanym żelazem rozkładzie i tworzeniu S -nitrozotiole [42, 43]. Niedawno uznano DNIC za potencjalną nową klasę donorów NO [44]. W zależności od właściwości ligandu w zakresie rozkładu ładunku elektronowego można wymodelować zdolność przekazywania NO przez DNIC [27], co umożliwia kontrolowanie przechowywania i transportu NO w formie DNIC. Opracowano syntezę licznych preparatów tego typu i obecnie są one badane jako donory tlenu azotu w biologii i medycynie, ze względu na stosunkowo niską toksyczność i dobrą stabilność [45–48]. **W pracy [B] zamieściłam przegląd wiedzy na temat struktury, właściwości chemicznych, działania biologicznego i syntezy DNIC, jaki był aktualny w roku 2011.** Z owej pracy przeglądowej wynikało, że pomimo wielu prób nie wyjaśniono jednoznacznie ani struktury chemicznej, ani biologicznego znaczenia wytworzonych *in vivo* DNIC o niskiej masie cząsteczkowej. W literaturze proponowano dwa główne miejsca wiążące dla niskocząsteczkowych kompleksów Fe-NO z ligandami: (i) ligandy zawierające siarkę (II), takie jak glutation [21], i (ii) pierścienie imidazolowe obecne w ugrupowaniach takich jak histydyna lub puryny [22]. Stwierdzono, że paramagnetyczne DNIC znalezione w tkankach na ogół charakteryzują się widmami EPR o wartości izotropowej  $g$  około 2,03 [49]. Sygnały EPR DNIC zostały zaobserwowane m. in. W ekstraktach ze szczurzej wątroby po podaniu pewnych chemicznych czynników rakotwórczych [50], charakterystyczny sygnał 2,03 uzyskano również w niektórych biomimetycznych związkach, które służyły jako modele centrów żelazowo-siarkowych w białkach ([2Fe-2S] lub [4Fe-4S]) reagujących z NO [9, 51–53]. W przypadku wysokocząsteczkowych DNIC (np. z białkami) obserwuje się osiową symetrię tensora czynnika  $g$ , np.  $g_{\perp}$  2,04;  $g_{\parallel}$  2,014, a w przypadku DNIC z ligandami o niskiej masie cząsteczkowej, jeśli sygnał mierzony jest w temperaturze pokojowej w rozpuszczalniku, obserwowany jest sygnał rombowy z powodu ułatwionego obrotu cząsteczki wokół osi [54, 55]. Wartości  $g$  różnią się nieznacznie w zależności od charakteru ligandu, ale widma dla każdego konkretnego kompleksu nie są odróżnialne w sposób, który pozwoliłby traktować każdy sygnał jako odcisk palca danego związku (przegląd danych spektroskopowych dotyczących DNIC przedstawiono w pracy [D]). Niemniej jednak zaobserwowano pewne prawidłowości, które mogłyby być podstawą do formułowania wniosków na temat otoczenia jonu centralnego w paramagnetycznej grupie Fe(NO)<sub>2</sub>, jeśli sygnały EPR zostałyby poddane dekonwolucji i starannie przeanalizowane. Przykład badania przedstawiającego zależność symetrii sygnału EPR w związanym z białkiem DNIC z rodzajem ligandu biorącego udział w tworzeniu kompleksu można znaleźć we wczesnej pracy Lee et al. [56]. Autorzy udowodnili, że sygnał EPR holoferrytyny jest kombinacją tego, który pochodzi z kompleksów związanych z resztami histydyny lub cysteiny. Dwa związki dawały nieco inne sygnały EPR, skupione wokół tej samej wartości 2,03, ale wykazujące różne symetrie - rombowa dla kompleksu histydylowego i osiowa dla cysteinyłowego. Podobne rozróżnienie sygnałów pochodzących od DNIC z modelowym ligandem tiolanowym i histydynyłowym jest



zaprezentowane w pracach [C] i [F] niniejszego osiągnięcia. **Prace [C] i [F] dostarczają analizy pochodzenia sygnałów EPR w DNIC z modelowymi ligandami o znaczeniu biologicznym. Pozwalają niejednoznacznie przypisać składnik widma EPR do typu ligandu biorącego udział w koordynacji żelaza w DNIC.**

Podczas gdy dinitrozylo-ditiolanowe kompleksy żelaza (II) są dobrze scharakteryzowane, rzadko badano biologiczne znaczenie DNIC, w których rolę ligandu pełniły grupy imidazolowe. W bardzo wczesnej publikacji [22] zaproponowano, że atom N7 pierścienia imidazolowego histydyny jest odpowiedzialny za koordynację żelaza w DNIC z białkami nie zawierającymi grup sulfhydrylowych. Dlatego, we wstępnych badaniach do prac [C] i [F] wyszłam od syntezy modelowych DNIC z tymi dwoma typami ligandów (DNIC z glutationem, GS-DNIC i DNIC z histydyną, HIS-DNIC). W **pracach [C] i [F] został poruszony aspekt biologicznych oddziaływań DNIC zawierających różne ligandy.**

Zgodnie z literaturą toksyczność składników DNIC wydaje się wzajemnie zależna. Bostanci i Bagirici [57–59] opisali osłabienie neurotoksyczności żelaza przez inhibitory syntazy tlenu azotu. z drugiej strony obecność donorów NO chroni przed nefrotoksycznością wywołaną przez żelazo [60]. Pokazana w innej pracy [11] zdolność jonów żelaza do ochrony komórek nowotworowych przed proapoptocznymi skutkami działania NO jest zgodna z tymi wynikami, pokazując wzajemne powiązania toksyczności tlenu azotu i żelaza. Zbieżny aktywny transport żelaza i glutationu na zewnątrz komórek, który, jak dowiedziono, jest zależny od MRP1 [15, 61] stanowił przesłankę, że wewnątrzkomórkowe żelazo może być usuwane przy udziale MRP1 w postaci DNIC (co zostało ostatecznie potwierdzone w roku 2012 [62]). Wykazano także, że obniżenie poziomu komórkowej puli glutationu uwrażliwia komórki na działanie donorów NO [63]. Wszystkie powyższe przykłady wzajemnej zależności toksyczności żelaza i NO skłoniły nas do postawienia pytania, czy przyczyną opisanych efektów może po prostu być wzajemne oddziaływanie chemiczne prowadzące do tworzenia się kompleksu. Celem badań opisanych w pracach [C] i [F] była ocena, czy tworzenie się DNIC może być przyczyną obniżenia toksyczności żelaza w obecności NO. Podczas badań wstępnych do tych prac założyłam, że możliwe jest tworzenie DNIC z ligandami o różnych stałych kompleksowania grupy  $\text{Fe}(\text{NO})_2$ , zgodnie z sugestiami zawartymi w literaturze. Dlatego, aby uzyskać wgląd w możliwe chemiczne aspekty koegzystencji żelaza i tlenu azotu w postaci DNIC, postanowiłam zbadać interakcje pomiędzy niskocząsteczkowymi kompleksami DNIC z histydyną (**praca [C]**) oraz glutationem (**praca [F]**) a DNA. Aby uzyskać wgląd w mechanizm oddziaływania DNIC z nicią DNA posłużyłam się metodą dichroizmu kołowego. Tworzenie kompleksów DNIC monitorowałam za pomocą spektroskopii EPR, FT/IR oraz UV/VIS. Przypisałam także pasma wibracyjne dla wodnego roztworu HIS-DNIC. Wyniki dichroizmu kołowego wskazują, że niskocząsteczkowe DNIC zmieniają konformację DNA w sposób zależny od dawki w pH 6. Zwiększenie pH buforu lub siły jonowej spowodowało zanik tego efektu. **Porównanie interakcji DNA-DNIC z efektem uwodnionego jonu  $\text{Fe}^{2+}$ , analiza wpływu pH i siły jonowej oraz typu zmian konformacyjnych nici DNA pozwoliły stwierdzić, że oddziaływanie DNIC-DNA ma charakter jonowy (prace [C] i [F]).**

O elektrostatycznym charakterze oddziaływania obu modelowych kompleksów z nicią DNA decyduje charakter jonu centralnego. Jednak, pomimo podobnego, jonowego charakteru oddziaływań z DNA zarówno kompleksu zawierającego grupy sulfhydrylowe jak i imidazolowe, skład strefy koordynacyjnej okazał się mieć zasadnicze znaczenie dla efektu DNIC na uszkodzenia DNA wywoływane w obecności reaktywnych form tlenu (nadtlenek wodoru). Wpływ procesu tworzenia DNIC na genotoksyczność jonów żelaza został potwierdzony w teście cięcia plazmidowego DNA. Traktowanie plazmidu za pomocą jonów żelaza skompleksowanych w formie HIS-DNIC w obecności  $H_2O_2$ , nie wpłynęło na intensywność cięcia plazmidowego DNA. HIS-DNIC indukował uszkodzenia nici DNA w stopniu porównywalnym do wolnego jonu żelaza. Efekt został całkowicie zniesiony przez dodanie deferoksaminy, specyficznego silnego chelatora żelaza. Nasze wyniki pokazują, że tworzenie się HIS-DNIC nie zapobiega uszkodzeniu DNA katalizowanemu przez żelazo. Odmienny efekt uzyskałam w przypadku sulfhydrylowego kompleksu DNIC-GSH. Zaobserwowałam znaczącą redukcję pęknięć plazmidowego DNA w przypadku żelaza związanego z GS-DNIC, w porównaniu z efektem cięcia DNA przez wolne jony żelaza. Przedstawione wyniki są zgodne z obserwacjami Gorbunova i wsp. [64] oraz Lu i Koppenol [65], którzy wykazali, że włączanie żelaza w kompleksy nitrozyłowe osłabia aktywność żelaza w reakcji Fentona. **Podsumowując, udowodniłam, że histydyna, a co za tym idzie niskocząsteczkowe imidazolowe DNIC nie wpływają ochronnie na genotoksyczność żelaza w warunkach biologicznej reakcji Fentona (praca [C]), podczas gdy tworzenie DNIC z tiolami chroni przed genotoksycznym działaniem jonów żelaza (praca [F]).** Należy jeszcze raz podkreślić, że o efekcie ochronnym decyduje skład DNIC a konkretnie rodzaj związanych ligandów. **Przedstawione dane rzucają światło na mechanizm wzajemnego genochronnego działania jonów żelaza i NO, który wcześniej obserwowano i opisano w literaturze. Weryfikują pochodzenie ligandów mających wpływ na zaobserwowany ochronny efekt, eliminując spośród kandydatów grupy imidazolowe. Uzupełniają wiedzę także na temat związanego z żelazem efektu ochronnego NO w warunkach stresu oksydacyjnego.**

Wiedza o konsekwencjach tworzenia DNIC wynikająca z naszych badań oraz badań innych autorów, według doniesień w literaturze światowej, zostały przeze mnie podsumowane w **pracy [E] (artykuł na zaproszenie)**. Koncepcja tej pracy zakładała opracowanie w formie podręcznikowej dotychczasowej wiedzy nt. biologicznych konsekwencji chemii koordynacyjnej związków nitrozyłowych. W niniejszej pracy **przedstawiłam reprezentatywne klasy nitrozyłowych kompleksów metali wraz z aspektami strukturalnymi, które mogą mieć konsekwencje dla biologicznego funkcjonowania tych kompleksów.** Podczas opracowania tego tematu zwróciłam uwagę na aplikacyjne aspekty chemii związków nitrozyłowych jako donorów tlenu azotu (zarówno w formie jonu nitrozyłowego, nitrozoniowego jak i formy rodnikowej NO) i z tego wynikło moje zainteresowanie rozwijaniem zastosowania DNIC jako donorów tlenu azotu. Jednocześnie fakt występowania regulatora jakim jest DNIC w szlakach sygnalizacji komórkowej [66] zainspirował mnie do poszukiwania kompatybilnych biologicznie nośników i wykorzystania naturalnych układów. To zainteresowanie zaowocowało grantem NCN 2012/07/D/ST4/02177, w którym wraz ze współpracownikami skupiłam się na poszukiwaniu

przenośników grup nitrozyl-żelazowych o strukturach zbliżonych do naturalnych, bądź naśladujących naturalne miejsca wiązania DNIC w układach biologicznych. Efektem tych badań są prace [G] oraz [H], zgłoszenie patentowe P-418581 (które otrzymało złoty medal na IWIS) oraz raport techniczny [67].

Ze względu na wzajemne zależności między NO, Fe i LDL w układzie sercowo-naczyniowym szczególnie interesującym zagadnieniem wydało się ustalenie, czy proces tworzenia DNIC powszechnie obserwowany dla różnych białek przechodzą także cząsteczki lipoprotein i jaki jest biologiczny los dinitrozylowych kompleksów żelaza z lipoproteinami. **Po raz pierwszy otrzymałam żelazo-nitrozylowany preparat LDL zawierający motyw Fe(NO)<sub>2</sub> (DNICLDL) i scharakteryzowałam go (praca [G]).** W celu przetestowania jego interakcji z potencjalnymi komórkami docelowymi, DNICLDL podawałam do komórek ludzkiego wątrobiaka HepG2. Efekty porównałam z wywołanymi przez natywne cząsteczki LDL (nLDL) i utlenione cząsteczki LDL (oxLDL, łączone z procesami agregacji płytki miażdżycowej). Podawanie DNICLDL znacznie zwiększyło całkowitą zawartość żelaza w badanej linii komórkowej, ale nie miało wpływu na poziom puli labilnych jonów dwuwartościowych (ulegających chelatacji kalceiną). Stwierdziłam, że DNICLDL jest mało toksyczny dla komórek. Badanie sugeruje, że DNICLDL może być potencjalnym przenośnikiem żelaza w postaci grup [Fe(NO)<sub>2</sub>]. **Niniejszym udowodniłam, że modyfikowane nanocząstki lipoproteiny o niskiej gęstości (DNICLDL) mogą służyć jako przenośniki Fe i NO w postaci stabilnych kompleksów z białkiem ApoB100 (białko składowe LDL).** W kolejnej pracy (praca [H]) skupiłam się na skutkach internalizacji lipoprotein modyfikowanych DNIC w makrofagach, ze szczególnym uwzględnieniem ich cytotoksyczności. Za pomocą DNICLDL traktowałam modelową linię komórkową mysich makrofagów, RAW 264.7. Podobnie jak w komórkach wątroby, także w makrofagach **administracja DNICLDL znacznie zwiększyła całkowitą zawartość żelaza. Wysokiemu wzrostowi żelaza towarzyszyła niska toksyczność w obu liniach komórkowych.** Jak wykazano w teście cięcia plazmidowego DNA *in vitro*, chelatacja żelaza w postaci DNICLDL silnie zmniejszyła uszkodzenie DNA wywołane przez żelazo i reaktywne formy tlenu (ROS). Ponadto DNICLDL, w przeciwieństwie do innych form LDL, nie powodował wzrostu ekspresji indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS), prawdopodobnie z powodu aktywności NO-donorowej DNIC. **Niniejszym udowodniłam, że NO moduluje toksyczność żelaza, co może znaleźć szczególne zastosowanie w preparatach będących nośnikami Fe i NO.**

Zagadnienia zaprezentowane w niniejszej rozprawie habilitacyjnej są także dodatkowo zawarte w innych publikacjach i opracowaniach mojego współautorstwa (monografie, raporty techniczne, doniesienia konferencyjne, zgłoszenie patentowe) które nie zostały włączone w obręb tego dzieła:

Monografia:

**Lewandowska, H.,** Kruszewski, M.: Dinitrosyl iron complexes in biological systems. 01/2006; IChTJ

Publikacja w czasopiśmie z listy B:

**Lewandowska H**, Brzóska K, Meczynska-Wielgosz S, Rumianek K, Wójciuk G, Kruszewski M. Dinitrozyłowe kompleksy żelaza–budowa i znaczenie biologiczne. *Postępy Biochem.* 2010;56(3).

Publikowane abstrakty konferencyjne:

Meczynska S, **Lewandowska H**, Sochanowicz B, Sadło J, Kruszewski M. Variable Inhibitory Effects on the Formation of Dinitrosyl Iron Complexes by Deferoxamine and Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone in K562 Cells\*. *Hemoglobin.* 2008;32(1–2):157–63.

Kruszewski M., **Lewandowska, H.**, Starzyński R.R., Bartłomiejczyk T., Iwaneńko T., Drapier JC., Lipinski P., 2004 - The role of labile iron pool and dinitrosyl iron complexes in nitric oxide genotoxicity. Society for Free Radical Research, International XII Biennial Meeting Buenos Aires, Argentina, May 5-9, 2004, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Supplement 1, p.

Wykład na zaproszenie:

Nitrozyłowe kompleksy żelaza – synteza, struktura i biologia, Konferencja Naukowa Chemików „Łączy nas Chemia”, 25-26 maja 2018, Białystok

Doniesienia konferencyjne:

**Lewandowska, H**, Stępkowski, T, Kruszewski, G. Wójciuk, The biocompatible carrier of iron, the process of its synthesis and medical use, 10th International Warsaw Invention Show, IWIS 2016 (gold medal).

**Lewandowska, H**, Stępkowski, T, Kruszewski, M, Formation of glutathionyl dinitrosyl iron complexes, does it alleviate iron genotoxicity? International Conference on BioInorganic Chemistry 16, Grenoble, France, July 22-26 2013.

Raporty techniczne:

**Lewandowska H**, Sadło J, Stępkowski T, Lankoff A, Łyczko K. Studies of the nitrosylation reaction of a phosphine complex modelling the iron centre of proteins from the cupin family. *Annual Rep. INCT* 2018;1848(1856):42.

Brzóska, K. **Lewandowska, H.**, Męczyńska, S., Sochanowicz, B., Sadło, J. & Kruszewski, M., Iron chelators inhibit DNIC formation to the same extent, independently of permeability. *Annual Rep. INCT* 2007, 99 (2007).

**Lewandowska, H.** & Kruszewski, M. Interaction of dinitrosyl iron complexes with DNA. *Annual Rep.* 2004 105 (2005).

Kruszewski, M. Starzyński, R., Bartłomiejczyk, T., Iwaneńko, T., Lipiński, P. & **Lewandowska, H.**, Dinitrosyl iron complexes induced in living cells by nitric oxide. *Annu. Rep.* 2003 100 (2004).

Kruszewski, M. Starzyński, M.R., Bartłomiejczyk, T., Iwaneńko, T., Lipiński, P. & **Lewandowska H.**, Effect of labile iron pool on genotoxicity induced by nitric oxide. Annu. Rep. 2003 99 (2004).

Zgłoszenie patentowe:

**Lewandowska, H.**, Wójciuk, G., Kruszewski, M., The biocompatible carrier of iron, the process of its synthesis and medical use P-418581 (Sep 08 2016).

## Podsumowanie

---

Przedstawione osiągnięcie naukowe obejmuje prace w których badano rozmaite aspekty tworzenia i przemian dinitrozylowych kompleksów żelaza w układach biologicznych. Osiągnięcie obejmuje badania podstawowe charakteryzujące źródła pochodzenia, sposoby koordynacji, uwarunkowanie powstawania, kinetykę przemian i biologiczne aspekty tworzenia DNIC w organizmach żywych a także badania o znaczeniu aplikacyjnym, pokazujące możliwość wykorzystania dinitrozylowych kompleksów żelaza z ligandami o pochodzeniu naturalnym jako przenośników żelaza i tlenu azotu w komórkach.

**Najważniejsze osiągnięcia wynikające z prac wchodzących w skład dzieła naukowego obejmują:**

- Udowodnienie kluczowej roli żelaza lizosomalnego w tworzeniu wewnątrzkomórkowych DNIC,
- Stwierdzenie kluczowej roli lizosomalnej puli żelaza w tworzeniu DNIC w warunkach *in vivo* oraz istotności lizosomalnej degradacji białek żelazowych dla tego procesu.
- Analizę składowych sygnału EPR pochodzącego od komórkowych DNIC dzięki badaniom kompleksów z modelowymi ligandami o znaczeniu biologicznym. Dostarczenie danych pozwalających niejednoznacznie przypisać składnik widma EPR do typu ligandu biorącego udział w koordynacji żelaza w DNIC.
- Porównanie interakcji pomiędzy DNA z DNIC oraz  $Fe^{2+}$ , analiza typu zmian konformacyjnych nici DNA oraz wpływu pH i siły jonowej na te zmiany, które pozwoliły stwierdzić, że oddziaływanie DNIC-DNA ma charakter jonowy.
- Określenie wpływu składu strefy koordynacyjnej w DNIC na genotoksyczność żelaza w warunkach biologicznej reakcji Fentona. Przedstawione dane rzucają światło na mechanizm wzajemnego genoprotekcyjnego działania jonów żelaza i NO, który wcześniej obserwowano i opisano w literaturze. Weryfikują pochodzenie ligandów mających wpływ na zaobserwowany ochronny efekt, eliminując spośród kandydatów grupy imidazolowe. Uzupełniają wiedzę także na temat związanego z żelazem efektu ochronnego NO w warunkach stresu oksydacyjnego.
- Otrzymanie po raz pierwszy żelazo-nitrozylowanego preparatu LDL zawierającego motyw  $Fe(NO)_2$  (DNICLDL) i scharakteryzowanie go.

- Odkrycie, że modyfikowane nanocząstki lipoproteiny o niskiej gęstości (DNICLDL) mogą służyć jako przenośniki Fe i NO w postaci stabilnych kompleksów z białkiem ApoB100 (białko składowe LDL), wykazujących niską toksyczność.

## Plany naukowe

---

Podczas moich badań nad DNIC zainteresował mnie aspekt przenoszenia kofaktorów takich jak metale przejściowe w postaci kompleksów z ligandami pochodzenia biologicznego. Naturalne układy, takie jak metaloproteiny czy lipoproteiny, poprzez precyzyjną złożoność swoich struktur są doskonale dopasowane do pełnienia określonych funkcji w organizmie, w ściśle kontrolowany sposób. Obecnie trwa poszukiwanie dużych agregatów o złożonej budowie, które mogłyby w sposób wielofunkcyjny uczestniczyć w procesach fizjologicznych. Między takimi syntetycznymi naśladowcami elementów funkcjonalnych żywego organizmu można wymienić m. in. nanostruktury (nanocząstki funkcjonalizowane przeciwciałem i lekiem lub warunkowo uwalniające ładunek w określonych przedziałach organizmu, nanorusztowania polimerowe). Obiekty te mają naśladować wielotorowe działanie naturalnych elementów konstrukcyjnych żywych układów. W mojej opinii w takich poszukiwaniach warto skorzystać ze struktur które, z uwagi na swoje naturalne pochodzenie, już są doskonale przystosowane do pełnienia określonych funkcji i precyzyjnie rozpoznawane w żywej komórce, jak np. badane przeze mnie ostatnio lipoproteiny. Dlatego w najbliższych latach planuję realizację projektów naukowych związanych z następującymi zagadnieniami:

- Wykorzystanie lipoproteiny o niskiej gęstości jako nośnika leków.
- Sposoby modyfikacji lipoprotein.
- Znakowanie lipoprotein izotopami promieniotwórczymi.

## Literatura

---

1. van Faassen E, Vanin AF (2007) Radicals for life: the various forms of nitric oxide. Elsevier Science Ltd, Amsterdam
2. Ignarro L (2000) Nitric oxide: Biology and Pathobiology
3. Hall CN, Attwell D (2008) Assessing the physiological concentration and targets of nitric oxide in brain tissue. J Physiol 586:3597–3615
4. Ischiropoulos H, Beckman JS (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? J Clin Invest 111:163–169
5. Liu B, Gao HM, Wang JY, et al (2002) Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. Ann NY Acad Sci 962:318–331

6. Enemark JH, Feltham RD (1974) Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl complexes. *Coord Chem Rev* 13:339–406
7. Nakamoto K (2009) Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry. John Wiley & Sons
8. Berto TC, Praneeth VK, Goodrich LE, Lehnert N (2009) Iron-porphyrin NO complexes with covalently attached N-donor ligands: formation of a stable six-coordinate species in solution. *J Am Chem Soc* 131:17116–17126. <https://doi.org/10.1021/ja904368n>
9. Tsai FT, Chiou SJ, Tsai MC, et al (2005) Dinitrosyl iron complexes (DNICs) [L<sub>2</sub>Fe(NO)<sub>2</sub>]- (L = thiolate): interconversion among {Fe(NO)<sub>2</sub>}<sup>9</sup> DNICs, {Fe(NO)<sub>2</sub>}<sup>10</sup> DNICs, and [2Fe-2S] clusters, and the critical role of the thiolate ligands in regulating NO release of DNICs. *Inorg Chem* 44:5872–5881. <https://doi.org/10.1021/ic0505044>
10. Henry Y, Ducrocq C, Drapier JC, et al (1991) Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J* 20:1–15
11. Feger F, Ferry-Dumazet H, Mamani MM, et al (2001) Role of iron in tumor cell protection from the pro-apoptotic effect of nitric oxide. *Cancer Res* 61:5289–5294
12. Vlasova MA, Vanin AF, Muller B, et al (2003) Detection and description of various stores of nitric oxide store in vascular wall. *Bull Exp Biol Med* 136:226–230
13. Denninger JW, Marletta MA (1999) Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411:334–350
14. Kubrina LN, Mikoyan VD, Mordvintcev PI, Vanin AF (1993) Iron potentiates bacterial lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in animal organs. *Biochim Biophys Acta* 1176:240–244
15. Watts RN, Hawkins C, Ponka P, Richardson DR (2006) Nitrogen monoxide (NO)-mediated iron release from cells is linked to NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7670–7675
16. Vanin AF, Men'shikov GB, Moroz IA, et al (1992) The source of non-heme iron that binds nitric oxide in cultivated macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1135:275–279
17. Ueno T, Yoshimura T (2000) The physiological activity and in vivo distribution of dinitrosyl dithiolato iron complex. *Jpn J Pharmacol* 82:95–101
18. Boese M, Keese MA, Becker K, et al (1997) Inhibition of glutathione reductase by dinitrosyl-iron-dithiolate complex. *J Biol Chem* 272:21767–21773
19. Becker K, Savvides SN, Keese M, et al (1998) Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nat Struct Biol* 5:267–271
20. Sheftel AD, Mason AB, Ponka P (2012) The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochim Biophys Acta BBA-Gen Subj* 1820:161–187



21. Vanin AF, Chetverikov AG (1968) [Paramagnetic nitrosyl complexes of heme and nonheme iron]. *Biofizika* 13:608–615
22. Woolum JC, Tiezzi E, Commoner B (1968) Electron spin resonance of iron-nitric oxide complexes with amino acids, peptides and proteins. *Biochim Biophys Acta* 160:311–320
23. De Maria F, Pedersen JZ, Caccuri AM, et al (2003) The specific interaction of dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex, a natural NO carrier, with the glutathione transferase superfamily: suggestion for an evolutionary pressure in the direction of the storage of nitric oxide. *J Biol Chem* 278:42283–42293
24. Kim YM, Chung HT, Simmons RL, Billiar TR (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J Biol Chem* 275:10954–10961
25. Cesareo E, Parker LJ, Pedersen JZ, et al (2005) Nitrosylation of human glutathione transferase P1-1 with dinitrosyl diglutathionyl iron complex in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 280:42172–42180
26. Kruszewski M (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 531:81–92
27. Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT (2006) Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J* 273:3106–3117
28. Pillay CS, Elliott E, Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363:417–429
29. Kroemer G, Jäätelä M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5:886
30. Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717–1721
31. Yu Z, Persson HL, Eaton JW, Brunk UT (2003) Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med* 34:1243–1252
32. Tenopoulou M, Doulias P-T, Barbouti A, et al (2005) Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J* 387:703–710
33. Persson HL, Kurz T, Eaton JW, Brunk UT (2005) Radiation-induced cell death: importance of lysosomal destabilization. *Biochem J* 389:877–884
34. Zanninelli G, Glickstein H, Breuer W, et al (1997) Chelation and mobilization of cellular iron by different classes of chelators. *Mol Pharmacol* 51:842–852
35. Laub R, Schneider Y-J, Octave J-N, et al (1985) Cellular pharmacology of deferoxamine B and derivatives in cultured rat hepatocytes in relation to iron mobilization. *Biochem Pharmacol* 34:1175–1183



36. Cable H, Lloyd JB (1999) Cellular uptake and release of two contrasting iron chelators. *J Pharm Pharmacol* 51:131–134
37. Hess JL, Hsieh CH, Brothers SM, et al (2011) Self-assembly of dinitrosyl iron units into imidazolate-edge-bridged molecular squares: characterization including Mossbauer spectroscopy. *J Am Chem Soc* 133:20426–20434. <https://doi.org/10.1021/ja208384d>
38. Martin-Diaconescu V, Kennepohl P (2007) Sulfur K-Edge XAS as a probe of sulfur-centered radical intermediates. *J Am Chem Soc* 129:3034–3035. <https://doi.org/10.1021/ja0676760>
39. Borisov V, Arutyunyan AM, Osborne JP, et al (1998) Magnetic circular dichroism used to examine the interaction of escherichia coli cytochrome bd with ligands. *Biochemistry* 38:740–750. <https://doi.org/10.1021/bi981908t>
40. Ueno T, Suzuki Y, Fujii S, et al (1999) In vivo distribution and behavior of paramagnetic dinitrosyl dithiolato iron complex in the abdomen of mouse. *Free Radic Res* 31:525–534
41. Vanin AF (1998) Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilization and transport of nitric oxide in biological systems. *Biochem Mosc* 63:782–793
42. Vanin AF, Papina AA, Serezhenkov VA, Koppenol WH (2004) The mechanisms of S-nitrosothiol decomposition catalyzed by iron. *Nitric Oxide* 10:60–73
43. Bosworth CA, Toledo JC, Zmijewski JW, et al (2009) Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 106:4671–4676
44. Severina IS, Bussygina OG, Pyatakova NV, et al (2003) Activation of soluble guanylate cyclase by NO donors--S-nitrosothiols, and dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide* 8:155–163
45. Borodulin RR, Kubrina LN, Mikoyan VD, et al (2013) Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO<sup>+</sup> donors. *Nitric Oxide* 29:4–16
46. Mitchell JB, Wink DA, DeGraff W, et al (1993) Hypoxic mammalian cell radiosensitization by nitric oxide. *Cancer Res* 53:5845–5848
47. Bourassa J, Lee B, Bernard S, et al (1999) Flash Photolysis Studies of Roussin's Black Salt Anion: Fe<sub>4</sub>S<sub>3</sub>(NO)<sub>7</sub>. *Inorg Chem* 38:2947–2952
48. Conrado CL, Bourassa JL, Egler C, et al (2003) Photochemical investigation of Roussin's red salt esters: Fe<sub>2</sub>(μ-SR)<sub>2</sub>(NO)<sub>4</sub>. *Inorg Chem* 42:2288–2293. <https://doi.org/10.1021/ic020309e>
49. Vanin AF, Faassen E van (2007) DNICs: Physico-chemical properties and their observations in cells and tissues. In: Ernst VF, Anatoly F (eds) *Radicals for Life*. Elsevier, Amsterdam, pp 19–73
50. Woolum JC, Commoner B (1970) Isolation and identification of a paramagnetic complex from the livers of carcinogen-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 201:131–140
51. Asanuma K, Iijima K, Ara N, et al (2007) Fe-S cluster proteins are intracellular targets for nitric oxide generated luminally at the gastro-oesophageal junction. *Nitric Oxide* 16:395–402

52. Crack JC, Smith LJ, Stapleton MR, et al (2010) Mechanistic insight into the nitrosylation of the [4Fe-4S] Cluster of WhiB-like Proteins. *J Am Chem Soc* 133:1112–1121
53. Drapier JC (1997) Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems. *Methods* 11:319–329
54. Timoshin AA, Vanin AF, Orlova TR, et al (2007) Protein-bound dinitrosyl-iron complexes appearing in blood of rabbit added with a low-molecular dinitrosyl-iron complex: EPR studies. *Nitric Oxide* 16:286–293
55. Kleschyov AL, Sedov KR, Mordvintcev PI, Vanin AF (1994) Biotransformation of sodium nitroprusside into dinitrosyl iron complexes in tissue of ascites tumors of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 202:168–173
56. Lee M, Arosio P, Cozzi A, Chasteen ND (1994) Identification of the EPR-active iron-nitrosyl complexes in mammalian ferritins. *Biochemistry* 33:3679–3687
57. Bostanci MO, Bagirici F (2007) Neuroprotection by 7-nitroindazole against iron-induced hippocampal neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol* 27:933–941
58. Bostanci MO, Bagirici F (2008) Nitric oxide synthesis inhibition attenuates iron-induced neurotoxicity: a stereological study. *Neurotoxicology* 29:130–135
59. Bostanci MO, Bagirici F (2008) Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron-induced neurotoxicity. *Brain Res Bull* 76:57–62
60. Gupta A, Sharma S, Chopra K (2008) Reversal of iron-induced nephrotoxicity in rats by molsidomine, a nitric oxide donor. *Food Chem Toxicol* 46:537–543
61. Watts RN, Richardson DR (2002) The mechanism of nitrogen monoxide (NO)-mediated iron mobilization from cells. NO intercepts iron before incorporation into ferritin and indirectly mobilizes iron from ferritin in a glutathione-dependent manner. *Eur J Biochem* 269:3383–3392
62. Lok HC, Rahmanto YS, Hawkins CL, et al (2012) Nitric oxide storage and transport in cells are mediated by glutathione S-transferase P1-1 and multidrug resistance protein 1 via dinitrosyl iron complexes. *J Biol Chem* 287:607–618
63. Fass U, Panickar K, Williams K, et al (2004) The role of glutathione in nitric oxide donor toxicity to SN56 cholinergic neuron-like cells. *Brain Res* 1005:90–100
64. Gorbunov NV, Yalowich JC, Gaddam A, et al (1997) Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron. Electron paramagnetic resonance evidence. *J Biol Chem* 272:12328–12341
65. Lu C, Koppenol WH (2005) Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide. *JBIC J Biol Inorg Chem* 10:732–738
66. Harrop TC, Song D, Lippard SJ (2006) Interaction of nitric oxide with tetrathiolato iron(ii) complexes: relevance to the reaction pathways of iron nitrosyls in sulfur-rich biological coordination environments. *J Am Chem Soc* 128:3528–3529

67. Lewandowska H, Sadło J, Stępkowski T, et al (2018) Studies of the nitrosylation reaction of a phosphine complex modelling the iron centre of proteins from the cupin family. Rap IChTJ Ser A 1848:42

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

### Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłam współautorem 5 prac naukowych, które można podzielić na trzy grupy według zagadnień:

#### Zagadnienia związane z genotoksycznością i naprawą DNA

1. **Lewandowska, H.** & Szumiel, I. Histone H2AX in DNA repair. Nukl.-Orig. Ed.- 47, 127–132 (2002).
2. Samochocka, K., Fokt, I., Anulewicz-Ostrowska, R., Przewłoka, T., Mazurek, A.P., Fuks, L., Lewandowski, W., Kozerski, L., Bocian, W., Bednarek, E., **Lewandowska, H.**, Sitkowski, J.: Platinum(II) and palladium(II) complexes with methyl 3,4-diamino-2,3,4,6- tetra-deoxy- $\alpha$ -L-lyxo-hexopyranoside. Dalton Transactions 07/2003; DOI:10.1039/b212681h

Prace te są wynikiem mojego zainteresowania procesami naprawy DNA oraz genotoksyczności. W pierwszym artykule dokonano przeglądu doniesień na temat roli fosforylowanego histonu H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Modyfikacja tego histonu jest ważną częścią odpowiedzi komórkowej na indukcję podwójnoniciowych pęknięć DNA (DSB) przez promieniowanie jonizujące i inne czynniki wytwarzające DSB. w napromieniowanej komórce modyfikacja jest przeprowadzana głównie przez ATM (ataxia-teleangiectasia-mutated), enzym, który uruchamia sygnalizację alarmu po indukcji DSB. Cząsteczki  $\gamma$ -H2AX pojawiają się w ciągu 1-3 min. po napromieniowaniu i tworzą ogniska w miejscach występowania DSB. Wydaje się to konieczne do rekrutacji czynników naprawy, które są później obecne w ogniskach uszkodzonych jąder. Co ciekawe, uszkodzenie podwójnoniciowe powoduje modyfikację stałej liczby cząsteczek H2AX a obszar ogniska fosforylacji ma obszar kilku megaparc zasąd DNA. Praca (1) pozwoliła mi na głębsze poznanie procesów związanych z uszkodzeniem DNA. W publikacji (2) wraz ze współautorami podjęłam próbę opracowania nowych pochodnych cisplatyny o poprawionych właściwościach terapeutycznych. Cisplatyna zabija komórki nowotworowe poprzez wiązanie z DNA i zakłócanie mechanizmu naprawy, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. Kompleks cisplatyna-DNA powoduje zniekształcenie nici DNA, co utrudnia jego naprawę. Nasze podejście do opracowywania kompleksów metali o bardziej selektywnych właściwościach przeciwnowotworowych opierało się na założeniu, że metal skompleksowany z ligandami, które mogą wiązać się ze

specyficznymi sekwencjami DNA, wywoła bardziej selektywne uszkodzenia DNA. w tym przypadku przygotowaliśmy nowy ligand potencjalnie oddziałujący z mniejszym rowkiem helisy DNA.

#### Wpływ rozkładu ładunku elektronowego na właściwości związków biologicznie aktywnych

3. Lewandowski, W., Kalinowska, M. & **Lewandowska, H.** The influence of metals on the electronic system of biologically important ligands. Spectroscopic study of benzoates, salicylates, nicotines and isoorotates. Review. J. Inorg. Biochem. 99, 1407–1423 (2005).
4. Lewandowski, W., Kalinowska, M. & **Lewandowska, H.** The influence of halogens on the electronic system of biologically important ligands: spectroscopic study of halogenobenzoic acids, halogenobenzoates and 5-halogenouracils. Inorganica Chim. Acta 358, 2155–2166 (2005).

Prace te na podstawie przeglądu literatury systematyzują wiedzę na temat sposobu, w jaki metale zakłócają i stabilizują układ elektronowy ligandów o znaczeniu biologicznym, w celu zrozumienia charakteru oddziaływań tych związków z ich celami biologicznymi (np. receptorami w komórce lub ważnymi składnikami komórki). Wyniki badań struktury elektronowej pozwalają przewidzieć pewne właściwości cząsteczki, takie jak jej reaktywność, trwałość związków kompleksowych i powinowactwo do enzymów. W/w prace, dotyczące wpływu rozkładu ładunku elektronowego na stabilność kompleksów metali z ligandami o znaczeniu biologicznym przyczyniły się do lepszego zrozumienia przez mnie znaczenia zdelokalizowanej struktury elektronowej grup Fe-N-O dla stabilności tlenku azotu w formie jego biologicznych przenośników.

#### Zagadnienia związane z odżywianiem i suplementacją tkanek metalami

5. Wagner, J., Glaza, R., Lewandowski, W., Hotowy, A., **Lewandowska, H.**, Surowiec, J., Kubat E., Zawartość mikro- i makroelementów w mięsie i niektórych wędlinach. Przem. Spoż. 54, 49–51 (2000).

W Polsce do głównych zagrożeń ekologicznych o odległych w czasie skutkach można zaliczyć pierwiastki szkodliwe dla zdrowia, zwłaszcza kadm, ołów i rtęć, zawarte w żywności. Na szczególną uwagę zasługuje ocena ich zawartości w całodziennym pożywieniu. Skuteczne przeciwdziałanie skażeniu żywności musi być poprzedzone badaniami jego poziomu, szczególnie w końcowym produkcie spożywczym, oraz ustaleniem miejsca i przyczyny zanieczyszczenia.

## Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

---

Poza publikacjami wymienionymi w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego oraz wymienionymi już w autoreferacie publikacjami na temat nitrozylowych kompleksów żelaza, niewłączonymi przeze mnie w skład dzieła (**1 monografia, 1 publikacja z listy B, 2 publikowane abstrakty, wykład na zaproszenie, 2 doniesienia konferencyjne, 5 raportów technicznych, 1 zgłoszenie patentowe**), po uzyskaniu stopnia doktora zostałam współautorką 9 innych prac badawczych opublikowanych w czasopiśmie. Moje zainteresowania naukowe poza tematem prezentowanego osiągnięcia naukowego można podzielić na dwa korespondujące ze sobą zagadnienia:

### Wpływ rozkładu ładunku elektronowego na właściwości związków biologicznie aktywnych.

1. Świdorski G, **Lewandowska H**, Świsłocka R, Wojtulewski S, Siergieńczyk L, Wilczewska A. Thermal, spectroscopic (IR, Raman, NMR) and theoretical (DFT) studies of alkali metal complexes with pyrazinecarboxylate and 2,3-pyrazinedicarboxylate ligands. *J Therm Anal Calorim.* 126, 205–224 (2016)
2. Świdorski G, **Lewandowska H**, Świsłocka R, Wojtulewski S, Siergieńczyk L, Wilczewska AZ, et al. Spectroscopic (IR, Raman, NMR), thermal and theoretical (DFT) study of alkali metal dipicolinates (2,6) and quinolinate (2,3). *Arab J Chem.* doi:10.1016/j.arabjc.2016.06.011
3. **Lewandowska, H.**, Meczyńska-Wielgosz, S.: Glikozylazy [4Fe-4S] i przenoszenie ładunku w DNA. *Postępy biochem.* 01/2010; 56(1):22-8.
4. Kowczyk-Sadowy, M., Świsłocka, R., **Lewandowska, H.**, Piekut, J. & Lewandowski, W. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR), Theoretical and Microbiological Study of trans o-Coumaric Acid and Alkali Metal o-Coumarates. *Molecules* 20, 3146–3169 (2015).

Prace te wynikają z kontynuacji zainteresowań sprzed doktoratu, dotyczących wpływu rozkładu ładunku elektronowego na właściwości związków biologicznie aktywnych. Trzy z nich stanowią badania nad korelacją struktury molekularnej i ładunku elektronowego związków fenolowych i ich aktywności biologicznej. Zbadano wpływ kationów metali na elektronowy ligandów. Zbadaliśmy związek między strukturą molekularną testowanych związków a ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Zastosowano komplementarne techniki spektroskopii molekularnej, takie jak podczerwień (FT-IR), Raman (FT-Raman), ultrafiolet-widoczny (UV-VIS) i jądrowy rezonans magnetyczny (<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-NMR). Struktury cząsteczek zostały zoptymalizowane, a ich charakterystyka strukturalna została obliczona za pomocą teorii funkcji gęstości (DFT). Obliczono także geometryczne i magnetyczne wskaźniki aromatyczności, ładunki atomowe, momenty dipolowe i energie. Parametry teoretyczne porównano z charakterystyką eksperymentalną badanych związków. Znalezione

korelacje między niektórymi pasmami wibracyjnymi a niektórymi parametrami metali, takimi jak elektroujemność, energia jonizacji, promień atomowy i jonowy. Zbadano aktywność mikrobiologiczną badanych związków. Czwarta praca dotyka zagadnień związanych ze zdolnością DNA do przenoszenia ładunku podobnie jak to ma miejsce w półprzewodnikach pasm wąskich dziur/luk. Wpływ na przenoszenie ładunku w obrębie DNA mogą mieć procesy tworzenia kompleksów z białkami, zarówno te zachodzące podczas normalnego przebiegu regulacji ekspresji genów, jak i te związane z procesami naprawy. z drugiej strony, potencjały oksydoredukcyjne białek zawierających metale mogą różnić się znacząco w zależności od tego czy są one wolne, czy też związane z DNA. Do takich białek należą glikozylazy [4Fe-4S], enzymy z klastrem żelazowo-siarkowym, biorące udział w procesie naprawy DNA przez wycinanie zasad. Istnieje hipoteza, że zaburzenie przenoszenia ładunku w DNA jest sygnałem uruchamiającym szlaki naprawy DNA.

### Polifenole, nutraceutyki

5. **Lewandowska, H.**, Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stępkowski, T. M. & Brzóska, K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J. Nutr. Biochem.* 32, 1–19 (2016).
6. **Lewandowska, H.**, Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stępkowski, T. & Brzóska, K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J. Nutr. Biochem.* (2015).
7. Kalinowska, M., Bielawska, A., **Lewandowska, H.**, Priebe, W. & Lewandowski, W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiol. Biochem.* 84, 169–188 (2014).
8. Niesteruk, A., **Lewandowska, H.**, Golub, Ż., Świsłocka, R. & Lewandowski, W. Zainteresujmy się rokitnikiem. preparaty z rokitnika zwyczajnego (*hippophae rhamnoides* L.) jako dodatki do żywności oraz ocena ich rynku w Polsce *Kosmos* 4, 571–581 (2013).
9. **Lewandowska, H.**, Jakubczak, A., Świsłocka, R., Stachelska, M. & Lewandowski, W. Zastosowanie metod analitycznych do wykrywania napromieniowania żywności: Przegląd najnowszych metod w świetle przepisów UE: radioliza impulsowa, spektroskopia w podczerwieni i spektroskopia Ramana w analizie napromieniowanej żywności. *Apar. Badaw. Dydakt.* 17, 79–85 (2012).

Te prace przeglądowe są wynikiem moich zainteresowań związanych z dodatkami do żywności, w tym ich obróbką chemiczną i fizyczną i jej konsekwencjami dla wartości odżywczej i zdrowotnej. Pokazują one m. in. zależność pomiędzy ogólnoustrojowym efektem działania składników żywności a wpływem tych substancji i ich metabolitów na szlaki sygnalizacji komórkowej. Dogłębna analiza mechanizmów tego oddziaływania może być pomocna w zrozumieniu zależności między dietą a procesami chorobotwórczymi oraz

w planowaniu strategii terapeutycznych wykorzystujących wspomagające działanie substancji naturalnie dostępnych w pożywieniu.

---

## 6. Dane bibliometryczne.

---

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania – **48,697**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitanta – **619**
- Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitanta (wg bazy Web of Science) bez autocytowań – **343**
- Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy Web of Science) – **9**

