

Prof. dr hab. Jan Czesław Dobrowolski
ul. Mickiewicza 65 m 1, 01-625 Warszawa

Warszawa, 6 marca 2019 r.

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-196 Warszawa

Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34
00-725 Warszawa

Recenzja dorobku i aktywności naukowej

Pani Doktor Hanny Lewandowskiej-Siwkiewicz z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej, ubiegającej się o nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego nauk chemicznych na podstawie monotematycznego cyklu ośmiu publikacji pod wspólnym tytułem: "Dinitrozyłowe kompleksy żelaza - synteza, struktura i biologia."

Pani Hanna Lewandowska-Siwkiewicz uzyskała stopień doktora nauk chemicznych 23 lutego 2006 r. w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej na podstawie rozprawy p.t.: *"Powstawanie, struktura i przemiany dinitrozyłowych kompleksów żelaza w modelowych układach biologicznych"*. Promotorem rozprawy był Pan Prof. dr hab. Marcin Kruszewski. Praca doktorska przesunęła w stronę biologii wcześniejsze zainteresowania Habilitantki, która w 2001 r. uzyskała stopień magistra chemii na Wydziale Chemii UW na podstawie pracy pt. *"Synteza i badanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych kompleksów diaminocukrowych Pd i Pt"*, promowanej przez Panią Prof. dr hab. Krystynę Marię Annę Samochocką.

Od skończenia studiów magisterskich Dr Hanna Lewandowska-Siwkiewicz pracuje (na stanowiskach od chemika do adiunkta) w Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej IChTJ. Lata 2006 - 2008 i 2010 - 2013 przeznaczyła na urlopy macierzyńskie i wychowawcze. Odebrała naukowe staże: trzytygodniowy w 2001 r. w MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA; w 2002 r. w Institute de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, Francja; trzymiesięczny w 2004 r. na Wydziale Chemii, University of Warwick, Warwick, Wielka Brytania; oraz tygodniowy w 2014 r. w Laboratory of Lipoproteins, Immunity and Atherosclerosis, Università degli Studi di Milano, Mediolan, Włochy; a w 2014 r. także tygodniowy w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technicznym w Szczecinie.

Habilitantka jest autorką lub współautorką 20. publikacji w liczących się międzynarodowych czasopismach naukowych oraz jednego zgłoszenia patentowego. 4 marca 2019 r. jej prace mają 350 cytowań "obcych" (Scopus) i indeks Hirscha równy 9. Kierowała projektem OPUS, oraz była wykonawcą 6 innych grantów NCN. Miała 3 wystąpienia na krajowych, a 2 na międzynarodowych konferencjach naukowych. Była autorem doniesień na 13. międzynarodowych i 2. krajowych konferencjach naukowych. Opublikowała 2 abstrakty konferencyjne. Współpracowała z 7. światowymi ośrodkami naukowymi. Z częścią z nich współpraca nadal trwa. W roku 2000 i 2005 współorganizowała 2. międzynarodowe konferencje w Warszawie. Otrzymała 3 nagrody Dyrektora IChTJ za prace naukowe i złoty medal na Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków w 2016 r. na Politechnice Warszawskiej za zgłoszenie patentowe. Wykonywała 8, a kierowała jednym statutowym projektem naukowym IChTJ. Ponadto miała zajęcia w szkole podstawowej i ze studentami w Wyższej Szkole Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży. Udzielała się także na Piknikach Naukowych Polskiego Radia oraz zamieszciała artykuł popularnonaukowy w Postępkach Techniki Jądrowej.

Te fakty dowodzą, że Dr Hanna Lewandowska-Siwkiewicz wykazuje solidną aktywność naukową realizowaną w więcej niż jednym ośrodku naukowym. Prowadziła też działalność dydaktyczną i popularnonaukową. Zatem Habilitantka spełnia tę część wymagań ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *"Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce"* (DzU RP Poz. 1668), która uzasadnia dalsze rozważania czy jej cykl publikacji pod wspólnym tytułem *"Dinitrozyłowe kompleksy żelaza - synteza, struktura i biologia."*, znacząco rozwija pewne aspekty badań chemii bionieorganicznej.

Niezbýt typowo dla prac habilitacyjnych, Pani Dr Hanna Lewandowska-Siwkiewicz utrzymała nurt badań realizowanych podczas doktoratu. W doktoracie zajmowała się powstawaniem, strukturą i przemianami dinitrozylowych kompleksów żelaza w modelowych układach biologicznych. Zazwyczaj habilitant szuka tematyki, za pomocą której mógłby wykazać swoją niezależność od "starego mistrza". Pomaga w tym staż postdoktorski lub współpraca z innym ośrodkiem naukowym. Jednak czasami pozostanie przy tematyce doktoratu jest uzasadnione. Po pierwsze wtedy, gdy jest to tematyka nowa i bardzo odkrywczą. Po drugie, gdy stwarza to szanse na donośne osiągnięcia aplikacyjne. Po trzecie zaś, gdy tematyka ta jest bardzo ważna i "cały świat" nad nią intensywnie pracuje. Tak było np. po odkryciu fulerenów, nanorurek i grafenu. Tak też się stało po rozwiązaniu struktury krystalograficznej bakteriorodopsyny i kolejnych struktur receptorów typu GPCR. Przypadek habilitacji Pani Dr Hanny Lewandowskiej-Siwkiewicz jest właśnie "trzeciego typu".

Na początku marca 2019 r. w bazie Scopus znajdują się dane 3893 prac przeglądowych z wyrażeniem "*nitric oxide*" w tytule, a Web of Science notuje 86175 prac z tym wyrażeniem w tytule. Jest też 1588 artykułów w czasopiśmie "*Nitric Oxide-Biology and Chemistry*", IF=4.367. Jeśli uwzględnimy jeszcze fakt przyznania w 1998 r. Nagrody Nobla z Fizjologii lub Medycyny Furchgottowi, Ignarro i Muradowi, za odkrycia sygnałowej roli NO w układzie sercowo-naczyniowym, to będziemy mieć jakieś wyobrażenie o wadze badań nad chemią i biochemią NO. Natomiast Scopus informuje o zaledwie 12. pracach przekrojowych z wyrażeniem "*dinitrosyl iron complex*" w tytule. Wyjaśnia to dlaczego Habilitantka nie porzuciła tematyki zainicjowanej w doktoracie. Pomimo wielkiego znaczenia NO dla biologii i medycyny, o dinitrozylowych kompleksach żelaza wiadomo znikomo niewiele.

Konsekwencją tego, że Pani Dr Lewandowska-Siwkiewicz została przy dawnej tematyce i realizowała ją w tym samym miejscu co doktorat jest to, że promotor Jej rozprawy doktorskiej jest współautorem 6. prac cyklu habilitacyjnego. Dwie pozostałe prace cyklu to jednoautorskie prace przeglądowe. Profesor Kruszewski jest w sumie współautorem 10. publikacji poświęconych molekułom NO. Jedną z nich związana jest z doktoratem Habilitantki, druga zaś inicjuje rozprawę habilitacyjną. Dwie pozostałe to prace o toksyczności tlenku tytanu i artykuł popularnonaukowy w *Postęпах Biochemii*. Widać zatem, że Prof. Kruszewski po zainicjowaniu tematyki przekazał ją Dr Lewandowskiej-Siwkiewicz, sam trzymając jedynie "rękę na pulsie". Jego oświadczenia współautora potwierdzają taki obraz. Także oświadczenia pozostałych współautorów wskazują na to, że Dr Lewandowska-Siwkiewicz odgrywała wiodącą rolę w kształtowaniu tematyki artykułów rozprawy i dlatego była pierwszym i korespondencyjnym autorem.

Pewien niepokój może budzić proporcja liczby prac przeglądowych (3) do oryginalnych (5). Dwa przeglądy w *Structure and Bonding* są jednoautorskie. W trzecim, opublikowanym w *Dalton Transactions* przez sześciuosobowy zespół, Habilitantka jest autorem pierwszym i korespondencyjnym. Myślę, że przy tysiącach prac o aktywności NO *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*, napisanie gruntownych artykułów przekrojowych było po prostu koniecznością. Prace te powstały w 2011, 2013 i 2014 r. i dzięki nim Dr Lewandowska-Siwkiewicz dobrze wytypowała cele badawcze Rozprawy.

Ostatnią kwestią rodzącą pytania formalne jest rozdzielnosc tematyki doktoratu i habilitacji. Dotyczy to zwłaszcza pracy A opublikowanej rok po doktoracie. W tej kwestii Autoreferat jest tak lakoniczny, że moje wątpliwości rozwiązała dopiero rozprawa doktorska wypożyczona z biblioteki. W doktoracie ustaliła ona, "że pula labilnego żelaza nie jest jedynym źródłem żelaza biorącym udział w tworzeniu DNIC *in vivo*, ale pełni ona szczególnie istotną rolę w powstawaniu tego kompleksu w komórkach, prawdopodobnie katalizując uwalnianie jonów żelaza z centrów żelazowych białek. Wykazano, że DNIC występują w komórkach zwierzęcych w postaci kompleksów z białkami o wysokiej masie cząsteczkowej (powyżej 100 kDa), zaś uwalnianie żelaza z centrów aktywnych białek podczas tworzenia DNIC powoduje wzrost ilości uszkodzeń DNA, natomiast oddziaływanie DNIC-DNA jest niespecyficzne i ma charakter jonowy." (*International Nuclear Information System (IAEA)*, https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:40057116). A zatem pytaniem doktoratu było to skąd pochodzi pula żelaza wchodzącego w dinitrozyłowe kompleksy. Czy jest to żelazo labilne, czy związane w białkach (komórki mysiej białaczki limfatycznej L5178Y-R i -S). W pracy A problem jest znacznie głębszy. Dotyczy lokalizacji żelaza w organelach komórkowych (ludzkich komórek erytroblastycznych K562), a nie pytania: "jest w białku, czy nie w białku?".

W artykule **A** (*J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007) habilitantka badała rolę labilnego żelaza w tworzeniu kompleksów dinitrozylowych w ludzkich komórkach erytroblastycznych K562. Stosując donor NO i dwie substancje chelatujące żelazo - jedną pokonującą bariery błon wewnątrzkomórkowych i drugą zatrzymywaną przez większość z nich i lokalizującą się głównie w przedziale lizosomalnym - monitorowała tworzenie się kompleksów dinitrozylowych za pomocą spektroskopii EPR. Po 6. godzinach obie substancje chelatujące blokowały powstawanie do 50% tych kompleksów. Następnie zabezpieczała rozkład białek lizosomalnych poprzez dodanie chlorku amonu hamującego tworzenie się kompleksów dinitrozylowych. W ten sposób ujawniała rolę degradacji białek zawierających żelazo podczas tworzenia kompleksów. Frakcjonowanie komórek po działaniu NO wykazało, że dinitrozylowe kompleksy żelaza są obecne przede wszystkim we frakcji endosomalno-lizosomalnej. A zatem żelazo pochodzące ze struktur endosomalno-lizosomalnych pełni zasadniczą rolę w powstawaniu kompleksów dinitrozylowych żelaza *in vivo*.

Artykuł **B** (*Dalton Trans.*, 2011) to artykuł przeglądowy, opisujący wiedzę na temat nitrozylowych (a przede wszystkim dinitrozylowych) kompleksów żelaza zgromadzoną do 2011 r. Pozwala on zrozumieć naturę tych kompleksów, ich preparatykę oraz możliwe oddziaływania i zachowanie *in vitro* oraz *in vivo*.

W pracy **C** (*Bioorg. Med. Chem.*, 2012) Habilitantka badała oddziaływanie histydynylo-dinitrozyłowego kompleksu żelaza z DNA za pomocą spektroskopii ECD wspomaganą pomiarami EPR i IR samych kompleksów. Widma ECD ujawniły, że obecność kompleksu zmienia konformację DNA. Genotoksyczność kompleksów żelaza potwierdzono za pomocą testów cięcia plazmidu (ang. *plasmid nicking assay*): przy małym stężeniu kompleksu plazmid pUC19 pozostawał niezmienny, a przy większym cięta była pojedyncza nić, lecz obecność substancji chelatującej żelazo powstrzymywała ten proces. Zatem związanie żelaza z NO w kompleksach histydynylo-dinitrozyłowych nie zabezpiecza DNA przed uszkodzeniami i nie ma bezpośredniego związku oddziaływania żelaza z NO na modyfikację genotoksyczności tych czynników.

Prace **D** i **E** (obie w *Struct. Bond.*, 2013) to znów artykuły przeglądowe. Pierwszy poświęcony jest metodom spektroskopii molekularnej (IR, Ramana, UV-Vis, Mössbauera, MCD, EPR, absorpcji rentgenowskiej i innym takim jak NRVS - ang. *Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy*) stosowanym w badaniach struktury i reaktywności nitrozyłowych kompleksów żelaza. Druga omawia chemię koordynacyjną NO w kontekście aktywności biologicznej i zastosowań takich kompleksów. Martwi mnie, że za dobrą znajomością angielskojęzycznej literatury przedmiotu nie idzie dobra znajomość terminologii polskiej. W habilitacji znajdujemy wyrażenia takie jak: "*paramagnetyczne jednojądrzaste $[Fe(NO)_2]^0$ DNIC*"; "*spektrometria masowa*"; "*rezonansowy Raman*" i "*ultrafiolet-widoczny*". Praca zawiera też wiele innych żargonowych wyrażeń, których przyszły promotor rozpraw doktorskich powinien się bardzo wystrzegać.

Kolejna publikacja **F** (*Dalton Trans.*, 2015) zaprzecza jednak wnioskowi pracy **C**. Pokazane jest wzajemne zmniejszanie genotoksyczności żelaza i NO, wtedy gdy substancje te współwystępują i mogą tworzyć kompleksy dinitrozyłowe. Atoli tym razem dinitrozyłowy kompleks żelaza nie był histydynyłowy tylko glutationyłowy. Pod wpływem tego kompleksu w stężeniu fizjologicznym ilość przecięć nici plazmidu pUC19 była mniejsza zarówno od tej powodowanej przez same jony żelaza, jony żelaza i glutation, jak i sam NO. Zatem w wypadku stresu oksydacyjnego, wtedy gdy obecny właściwy ligand siarkowy taki jak glutation, jony żelaza i NO wzajemnie "neutralizują" swoją toksyczność.

W zeszłorocznej pracy **G** (*BioFactors*, 2018) Dr Lewandowska-Siwkiewicz związała dinitrozyłowy kompleks żelaza z lipoproteiną LDL ("*złym cholesterolem*"). Taki koniugat podała do modelowych komórek ludzkiego wątrobiaka HepG2. W porównaniu do działania samego i utlenionego LDL, koniugat znacząco zwiększał stężenie żelaza w linii komórkowej, nie zaburzając puli jonów chelatowanych kalceiną. Wzrostowi stężenia żelaza nie towarzyszył jednak wzrost toksyczności. Stąd przypuszczenie, że koniugat mógłby być zastosowany jako transporter (dinitrozyłowego kompleksu) żelaza do komórek wątrobiaka.

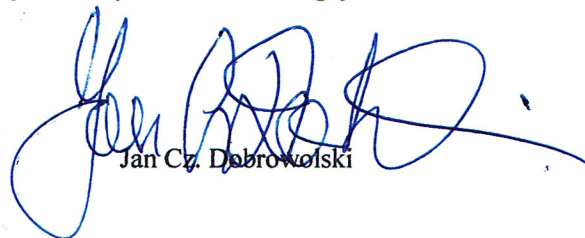
W ostatniej z prac cyklu habilitacyjnego **H** (*J. Inorg. Biochem.*, 2018) Habilitantka kontynuowała badania problemu postawionego w pracy poprzedniej. Obserwowała cytotoksyczność koniugatu dinitrozyłowego kompleksu żelaza z lipoproteiną LDL względem komórek mysich fagocytów (ze szpiku kostnego) linii RAW 264.7. Tak jak uprzednio, podanie koniugatu zwiększało stężenie całkowitego żelaza i umiarkowany

wzrost toksyczności. Test *in vitro* cięcia plazmidu wykazał, że związanie dwóch molekuł NO w kompleksie żelaza zdecydowanie redukuje stężenie reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych za uszkodzenia DNA. Ponadto w przeciwieństwie do innych formy białek LDL, nie zwiększa ono ekspresji syntazy tlenu azotu.

A zatem Pani Dr Lewandowska-Siwkiewicz w swojej rozprawie habilitacyjnej ustaliła, że zasadniczą rolę w powstawaniu kompleksów dinitrozylowych żelaza *in vivo* pełni żelazo pochodzące ze struktur endosomalno-lizosomalnych. Udowodniła, że związanie żelaza z tlenkiem azotu w kompleksach histydynylo-dinitrozylowych nie chroni DNA przed uszkodzeniami, natomiast w kompleksach glutationylo-dinitrozylowych je zabezpiecza. W pierwszym wypadku genotoksyczność żelaza z NO nie zmienia się, a w drugim czynniki te wzajemnie się "neutralizują". Wreszcie związała dinitrozylowy kompleks żelaza z lipoproteiną LDL i zaobserwowała, że koniugat taki mógłby być transporterem dinitrozylowego kompleksu żelaza do komórek ludzkiego wątrobiaka oraz komórek układu immunologicznego.

To są istotne ustalenia implikujące ważne kierunki działań. Dzięki Jej pracom wiemy w jakich organellach jest żelazo dostępne dla NO i jakie ligandy zabezpieczają przed toksycznym działaniem żelaza i tlenu azotu. Mamy też przepis jak selektywnie dotrzeć (z lekiem) do wybranych komórek. Jest to ważne np. przy przeszczepach, chorobach nerek czy serca. Wtedy można też dokonywać innych modyfikacji i docierać np. do komórek nowotworowych: Należy zmodyfikować lipoproteinę LDL za pomocą dinitrozylowego kompleksu żelaza lub analogicznego kompleksu. Z planów naukowych Habilitantki wynika, że rozważa także analogi radioaktywne przydatne w diagnostyce lub terapii chorób nowotworowych. Należy dodać, że tak lakonicznie streszczone przeze mnie osiągnięcia naukowe Pani Dr Hanny Lewandowskiej-Siwkiewicz wymagały jednak ogromnego wysiłku badawczego zespołu realizującego prace pod jej kierunkiem. Z jednej strony należało posługiwać się biegle warsztatem chemii bionieorganicznej (syntezy nieorganiczne i bionieorganiczne oraz rejestracja i interpretacja widm takich układów wykonanych wieloma technikami spektroskopii molekularnej), z drugiej zaś strony trzeba było stosować zaawansowane metody biologii molekularnej, oznaczania geno- i cytotoxyczności, cięcia DNA plazmidów, frakcjonowanie białek i organelli itp. Takie szerokie multidyscyplinarne podejście znamionuje jedynie dojrzałe zespoły.

Podsumowując moją recenzję dorobku i aktywności naukowej Pani Doktor Hanny Lewandowskiej-Siwkiewicz i biorąc pod uwagę wymagania ustawy z dnia 14 marca 2003 r. "*o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki*" (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i ustawy z dnia 3 lipca "*Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*" (Dz.U. 2018 poz. 1669) stwierdzam, że Pani Doktor Hanna Lewandowska-Siwkiewicz wykazuje dobrą aktywność naukową realizowaną głównie w Polsce, ale także i zagranicą, a cykl Jej publikacji pod tytułem "*Dinitrozylowe kompleksy żelaza – synteza, struktura i biologia*", stanowi znaczące osiągnięcie rozwijające badania bionieorganiczne z pogranicza biologii molekularnej. W moim przekonaniu spełnia Ona wymagania wyżej wymienionych ustaw i zasługuje na nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego nauk chemicznych.



Jan Cz. Dobrowolski