

Poznań, 29.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Otręby

zatytułowanej

Synteza i struktura estrów i soli kwasu hypodifosforowego

Życie na ziemi nie zaistniałoby bez związków fosforu, zarówno organicznych jak i nieorganicznych. Związki te pełnią kluczową rolę w reakcjach biochemicznych, szlakach metabolicznych i procesach komórkowych. Ze względu na szerokie spektrum funkcji pełnionych przez naturalnie występujące związki fosforu poszukuje się ich analogów licząc przede wszystkim na efekt terapeutyczny, ale również na zastosowania agrochemiczne czy też, niestety, w charakterze broni chemicznej. Wystarczy wspomnieć lek remdesiwir, amidodiestrową pochodną kwasu fosforowego o szerokim spektrum aktywności przeciwwirusowej, dopuszczoną przez FDA w 2020 r. jako pierwszy lek do stosowania w leczeniu COVID-19.

Już w drugiej połowie ubiegłego wieku spostrzeżono, że ze względu na podobieństwo strukturalne kwas hypodifosforowy lub jego pochodne mogą być wykorzystane jako zamienniki difosforanów w ich szlakach metabolicznych. Badania nad taką funkcją hypodifosforanów i ich estrów skupiały się głównie na syntezie i aktywności biologicznej, natomiast aspekt strukturalny, szczególnie w przypadku organicznych połączeń hypodifosforanów, był rzadko poruszany. Nieco szerzej badane były strukturalnie hypodifosforany nieorganiczne a w ostatnich latach znaczny wkład w poznanie krystalografii tych połączeń mają krystalografowie z Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN.

Recenzowana przez mnie praca doktorska mgr Marty Otręby stara się wypełnić lukę w badaniach nad kwasem hypodifosforowym i jego pochodnymi, gdyż dotyczy ona syntezy i badań strukturalnych estrów nukleozydowych tego kwasu, jego soli z nukleozydami, zasadami purynowymi i cytozyną oraz nieorganicznych hypodifosforanów sodowych. Promotorem rozprawy jest dr hab. Katarzyna Ślepokura z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jako doświadczona recenzentka muszę na samym wstępie zaznaczyć, że niezwykle rzadko zdarzało mi się opiniować pracę wykonaną i napisaną tak solidnie.

Główna część rozprawy liczy 169 stron. Ponadto do rozprawy dołączony jest spory suplement zawierający w części pierwszej kopie dwóch publikacji, których Doktorantka jest współautorem i które są tematycznie związane z rozprawą. W części drugiej suplementu zamieszczone zostały liczne tabele, rysunki i schematy zawierające szczegółowe informacje dotyczące prowadzonych badań. Do pracy dołączone zostały na dysku CD pliki w formacie *cif* dla opisywanych w rozprawie struktur kryształów oraz pliki wygenerowane programem *checkcif* z informacją o przebiegu procesu walidacji danych strukturalnych. Praca zaczyna się spisem treści, wykazem stosowanych skrótów i bardzo przydatnym wyjaśnieniem dotyczącym przyjętego w rozprawie nazewnictwa tlenowych kwasów fosforowych i ich soli. Wstęp literaturowy do rozprawy przygotowany został niezwykle rzetelnie i czyta się go

bardzo dobrze. Zawiera on treści ogólne, które wprowadzają czytelnika w tematykę rozprawy a jednocześnie treści bardziej szczegółowe przydatne przy czytaniu kolejnych rozdziałów. Doktorantka omawia rolę biologiczną związków fosforu, właściwości i syntezę kwasu hypodifosforowego oraz stan badań strukturalnych dla nieorganicznych i organicznych związków tego kwasu. Dalsza część wstępu dotyczy metod syntezy estrów kwasu hypodifosforowego, stanu wiedzy o aktywności biologicznej tych estrów oraz hypodifosforanów nieorganicznych. Dodam, że Doktorantka jest współautorką bardzo ciekawej pracy przeglądowej dotyczącej kwasu hypodifosforowego i jego soli, która ukazała się niedawno w Wiadomościach Chemicznych. Wstęp do rozprawy kończy rozdział dotyczący krystalochemii nukleozydów i nukleotydów, w którym Doktorantka omawia parametry stosowane w opisie konformacji nukleozydów i nukleotydów oraz oddziaływania międzycząsteczkowe występujące w tych układach. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka doskonale orientuje się w literaturze dotyczącej zagadnień związanych z tematyką rozprawy.

W kolejnych dwóch rozdziałach pani mgr Otręba formułuje cel prezentowanych badań oraz zakres działań podjętych do jego realizacji. W ramach rozprawy miała być przeprowadzona przede wszystkim synteza i badania strukturalne estrów nukleozydowych kwasu hypodifosforowego. W efekcie powinno to doprowadzić do uzyskania charakterystyki supramolekularnej ugrupowania hypodifosforanowego w jego połączeniach organicznych zawierających azotowe zasady organiczne oraz wskazać na różnice i podobieństwa w budowie tych estrów w zestawieniu z analogami difosforanowymi występującymi naturalnie. Jednakże, z dwóch pochodnych estrowych adenozyiny, które Doktorantka zsyntezowała, tylko 5'-hypodifosforan 2':3'-izopropylidenoadenozyiny (AhDP), utworzył krystaliczne sole. Ze względu na problemy związane z syntezą estrów kwasu hypodifosforowego oraz by mieć ogólniejszy pogląd na stosunkowo słabo poznaną krystalochemię kwasu hypodifosforowego i jego soli, zakres rozprawy został poszerzony o syntezę i badania strukturalne soli tego kwasu z zasadami azotowymi jak również jego soli sodowych.

W rzetelnie i kompetentnie przygotowanej części eksperymentalnej mgr Otręba omawia procedury eksperymentalne prowadzące do otrzymania badanych połączeń chemicznych oraz przebieg rentgenowskiej analizy strukturalnej dla 33 otrzymanych kryształów. Już dawno w rozprawie doktorskiej nie spotkałam się z tak porządnym opisem badań rentgenograficznych i tak solidnie przeprowadzonymi badaniami strukturalnymi. Dla wszystkich badanych kryształów dane dyfrakcyjne zebrane zostały w niskich temperaturach. W przypadku związku **2z**, którego kryształy w niskich temperaturach miały strukturę niewspółmiernie modulowaną Doktorantka wyznaczyła strukturę w 100 K pomijając refleksy satelitarne oraz w 330 K, gdy modulacja struktury zanikła. W przypadku kryształu związku **6n** zaobserwowała odwracalną przemianę fazową zachodzącą ze wzrostem temperatury od fazy trójskośnej do fazy jednoskośnej i dla obydwu faz określiła strukturę. W trakcie obliczeń strukturalnych mgr Otręba musiała często sobie radzić ze skomplikowanym nieporządkiem, który niejednokrotnie utrudniał interpretację wyników. Wśród innych metod badawczych stosowanych w rozprawie przez Doktorantkę znajdują się również spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego i rentgenowska dyfraktometria proszkowa. Pani mgr Otręba w czasie realizacji pracy szeroko wykorzystywała również strukturalne bazy danych takie jak CSD i ICSD.

W najobszerniejszym fragmencie rozprawy omówione są wyniki i przeprowadzona ich dyskusja. Doktorantka otrzymała siedem soli sodowych kwasu hypodifosforowego. Wśród czynników wpływających na skład otrzymanych produktów krystalicznych mgr Otręba wskazuje temperaturę oraz stosunek molowy substratów użytych do syntezy. Do tej pory znane były struktury trzech soli sodowych tego kwasu, w tym soli $\text{Na}_2(\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_6) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ służącej do otrzymywania i przechowywania kwasu hypodifosforowego. Badania dehydratacji tej soli przeprowadzone przez Doktorantkę metodą TG/DSC oraz metodą

dyfraktometrii proszkowej pokazały, że proces ten przebiega jednostopniowo i prowadzi do powstania trwałej formy bezwodnej **4s**, otrzymanej i scharakteryzowanej przez Doktorantkę.

Kolejna grupa kryształów opisanych w rozprawie składa się z dziesięciu soli hypodifosforanowych zasad purynowych oraz cytozyny, spośród których w sześciu solach stosunek molowy kation:PP wynosi 1:1 natomiast w pozostałych czterech stosunek ten wynosi 2:1. Z wyjątkiem soli **1z** zawierającej dikation AdeH_2^{2+} , w pozostałych solach komponent organiczny występował w postaci monokationu.

Doktorantka otrzymała trzynaście soli hypodifosforanowych z nukleozydami i ich analogiem cytarabiną, z tym że w przypadku związku **1n**, jak słusznie zauważa, związek ten powinien być zakwalifikowany jako kokryształ jonowy ze względu na obecność neutralnych cząsteczek adenozy. W solach tych jon PP występował w postaci mono- lub dianionu, ale w dwóch solach, z cytydyną i deoksycytydyną, otrzymała również formy z całkowicie zdeprotonowanymi anionami PP. Są to pierwsze znane hypodifosforany organiczne zawierające aniony $\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$. Doktorantka zaobserwowała, że w przypadku soli z kationami organicznymi stosunki molowe substratów użytych w syntezie nie determinują składu otrzymanych soli.

Do ostatniej grupy badanych kryształów należą estry nukleozydowe kwasu hypodifosforowego reprezentowane w rozprawie przez trzy sole, sodowe lub potasowe, 5'-hypodifosforanu 2':3'-izopropylidenoadozyny (AhDP).

W dalszej części rozdziału 'Wyniki i dyskusja' Doktorantka analizuje w sposób bardzo systematyczny budowę kryształów, oddzielnie dla każdej z wymienionych powyżej czterech grup soli kwasu hypodifosforowego lub jego estrowej pochodnej. Opisy te są zwarte a jednocześnie wyczerpujące i poruszają wszystkie możliwe aspekty geometryczne i topologiczne tych skomplikowanych struktur krystalicznych. Dodam, że sporą pomocą w czytaniu tego rozdziału są starannie przygotowane i przemyślane ilustracje i tabele.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka analizuje budowę molekularną hypodifosforanowej pochodnej estrowej 2':3'-izopropylidenoadozyny (AhDP), analogu 5'-difosforanu adenozy ADP, która wchodzi w skład kryształów **1e-3e**. Omawia tutaj takie zagadnienia jak konformacja wokół wiązania β -N-glikozydowego, pofałdowanie pierścienia cukrowego, konformacja oraz geometria estrowej grupy hypodifosforanowej. Następnie porównuje strukturę AhDP z nielicznymi znanymi strukturami ADP. Wnioskiem wynikającym z tych porównań jest podobieństwo konformacji AhDP w badanych kryształach do naturalnie występującego ADP. Kolejna analiza dotyczy budowy nukleozydów, które obecne są w kryształach **1n-13n**. Tutaj Doktorantka również porównuje szczegółowo ich konformacje, wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe i zestawia te dane ze znanymi strukturami soli nukleozydowych, wskazując na standardowe wartości otrzymanych parametrów konformacyjnych nukleozydów w badanych kryształach, Mgr Otręba kończy omawianie struktur molekularnych przeglądem budowy anionów (lub cząsteczki) kwasu hypodifosforowego, przy czym skupia się głównie na porównaniu połączeń organicznych i nieorganicznych. Zauważa, że częstość występowania poszczególnych form zjonizowanych kwasu hypodifosforowego, jak również jego formy obojętnej, jest różna dla tych dwóch typów połączeń. Widać to szczególnie dobrze dla monowodorohypodifosforanów, które są nieobecne wśród połączeń organicznych, oraz samego kwasu, który dużo chętniej tworzy tzw. kokryształy jonowe w układach organicznych niż nieorganicznych.

Po omówieniu struktur molekularnych Doktorantka przystąpiła do podsumowania aspektów supramolekularnych badanych struktur kryształów. Rozważania zaczęła od analizy oddziaływań międzynukleotydowych i koordynacji do jonów Na^+ i K^+ w kryształach **1e-3e**. Pokazała, że oddziaływania π - π między układami aromatycznymi oraz oddziaływania zasada-hypodifosforan determinują budowę kryształów tych estrów. Ważną rolę odgrywają też

oddziaływania z jonami Na^+ i K^+ . Jedna z niezależnych jednostek AhDP koordynuje zawsze w kryształach jon metalu w sposób bidentny przez atom N7 pierścienia puryny oraz przez atom tlenu grupy PP. Tej interakcji towarzyszą oddziaływania z cząsteczką wody, która koordynuje jon metalu i jednocześnie pełni rolę akceptora w wiązaniu wodorowym z grupą N6-H nukleozasady. Tak skoordynowany jon metalu stabilizuje konformację AhDP. Brak chelatującego oddziaływania z jonem metalu, jak to ma miejsce dla drugiej symetrycznie niezależnej jednostki, zwiększa elastyczność konformacyjną estru, co objawia się w kryształach nieporządkiem w fragmencie hypodifosforanowym. Doktorantka zauważyła, że obserwowany w kryształach **1e-3e** chelatujący sposób wiązania jonu metalu przez jednostkę nukleotydową jest rzadki i nie był obserwowany do tej pory w strukturach ADP. Oddziaływania między nukleozasadą a fragmentem hypodifosforanowym zachodzą głównie przez atomy N1 i N6 znajdujące się na krawędzi Watsona-Cricka adeniny oraz atomy tlenu PP z tej samej grupy PO_3 . Te wiązania wodorowe generują motyw R2,2(8), który, jak pokazały dalsze analizy Doktorantki, pojawia się systematycznie również w solach adeninowych i połączeniach zawierających fragment cytozyny.

Bardzo ciekawy fragment dyskusji dotyczy zaobserwowanego przez mgr Otrębę oddziaływania wolnej pary elektronowej na atomie tlenu z grupy PP, lub karbonyłowego atomu tlenu nukleozasady, z układem π -elektronowym zasady azotowej. Oddziaływania tego typu dostrzegła ona we wszystkich solach hypodifosforanowych zasad purynowych (**1z-9z**) oraz w kilku kryształach soli nukleozydowych. Dodam, że oddziaływania tego typu, choć wydają się być dość powszechne, są często pomijane podczas dyskusji oddziaływań w układach supramolekularnych.

Rozdział ‘Wyniki i dyskusja’ kończy analiza topologii wiązań wodorowych między grupami hypodifosforanowymi w strukturach soli organicznych oraz oddziaływań anionów PP z jonami Na^+ w solach nieorganicznych **1s-7s**.

Całą rozprawę zamyka dwustronicowe podsumowanie, bardzo starannie przygotowana bibliografia licząca 205 pozycji, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz dotychczasowego dorobku naukowego Doktorantki.

Jak wspomniałam wcześniej cała rozprawa przygotowana została niezwykle starannie zarówno pod względem merytorycznym jak i edycyjnym. Bardzo nieliczne potknięcia, które dostrzegłam to:

- używanie słowa ‘ilość’ zamiast ‘liczba’ w przypadku rzeczowników policzalnych (ilość struktur, ilość refleksów, ilość wiązań),
- użycie na str. 48 określenia ‘konfiguracja absolutna’ zamiast bardziej poprawnego w tym kontekście ‘struktura absolutna’,
- na str. 149 znalazłam niezręczne sformułowanie ‘Otrzymane kryształy estrów...przyjmują w ciele stałym konformację...’ zamiast ‘w otrzymanych kryształach...cząsteczki AhDP przyjmują konformację’,
- w tabeli 9 zgodnie z opisem powinny być podane wszystkie parametry kątowe komórki elementarnej a nie tylko kąt β ,
- na str. 6 pojawił się jedyny błąd ortograficzny w rozprawie: ‘biomolekół’ zamiast ‘biomolekuł’.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Marty Otręby posiada wysokie walory poznawcze, gdyż w sposób wartościowy poszerzyła naszą obecną wiedzę dotyczącą struktury oraz aspektów supramolekularnych budowy soli organicznych i nieorganicznych kwasu hypodifosforowego oraz jego estrów nukleozydowych. Doktorantka jawi mi się jako

sumienny badacz o dużych umiejętnościach z zakresu syntezy chemicznej oraz o sporej biegłości w rentgenowskiej analizie strukturalnej kryształów. Poza zdolnościami eksperymentalnymi przygotowanie tej rozprawy wymagało od niej bez wątpienia rozległej wiedzy z chemii, biochemii i krystalografii.

Nie mam wątpliwości, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Marty Otręby spełnia bez zastrzeżeń wymogi stawiane pracom doktorskim i z tych względów wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Mart Otręby do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę jakość prezentowanych wyników oraz wysoki poziom rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.

Marta Otręba

Uniwersytet Wrocławski Wydział Chemii (2)		
Wpłynęło do WCH	06 -06- 2022	Załączniki
Wpl. do jedn. org.	Data	Symbol
Znak sprawy		



Poznań, 29.05.2022

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marty Otręby

zatytułowanej

Synteza i struktura estrów i soli kwasu hypodifosforowego

Recenzowana przez mnie praca doktorska mgr Marty Otręby, której promotorem jest dr hab. Katarzyna Ślepokura, wypełnia w dużym stopniu lukę w badaniach strukturalnych nad kwasem hypodifosforowym i jego pochodnymi. Rozległe badania strukturalne obejmujące rentgenowską analizę strukturalną 33 soli organicznych i nieorganicznych oraz estrów kwasu hypodifosforowego przeprowadzone zostały i opisane w sposób niezwykle rzetelny. Rozległa dyskusja otrzymanych wyników porusza w sposób systematyczny i wyczerpujący wszelkie możliwe aspekty strukturalne badanych połączeń. Niezwykle rzadko zdarzało mi się do tej pory opiniować pracę wykonaną i napisaną tak solidnie.

Materiał rozprawy jest już częściowo opublikowany w pracy przeglądowej w Wiadomościach Chemicznych oraz pracy oryginalnej w czasopiśmie specjalistycznym Acta Cryst sect. C. Doktorantka jest ponadto współautorem sześciu innych prac w bardzo dobrych czasopismach chemicznych

Biorąc pod uwagę jakość prezentowanych wyników, walory poznawcze oraz wysoki poziom rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie.

Maria Gdaniec

