

На правах рукописи



Морозова Анна Сергеевна

**САМОСБОРКА РЯДА КОРОТКОЦЕПНЫХ ОЛИГОПЕПТИДОВ С
ОБРАЗОВАНИЕМ МИКРО- И НАНООБЪЕКТОВ И ИХ СВОЙСТВА ПО
ДАНЫМ СКЕНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

1.3.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний
вещества

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка – 2023

Работа выполнена в лаборатории физики и химии поверхности Казанского физико-технического института им. Е.К. Завойского – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Научный руководитель: Доктор физико-математических наук, профессор
Бухараев Анастас Ахметович

Официальные оппоненты: **Миронов Виктор Леонидович**
Доктор физико-математических наук
Институт физики микроструктур РАН - филиал
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-
Грехова Российской академии наук», отдел
магнитных наноструктур, ведущий научный
сотрудник

Крупин Александр Сергеевич
Кандидат химических наук, доцент
Институт полимеров ФГБОУ ВО «Казанский
национальный исследовательский технологический
университет», кафедра физической и коллоидной
химии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Уфимский университет науки и технологий»

Защита состоится «12» октября 2023 года в 10 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 24.1.108.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ФИЦ ПХФ и МХ РАН) по адресу: 142432, Московская обл., г.Черноголовка, проспект академика Семенова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФИЦ ПХФ и МХ РАН www.icp.ac.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук



Екатерина Викторовна Золотухина

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы. В настоящее время значительный интерес исследователей привлекают короткоцепные олигопептиды, способные к самосборке и самоорганизации с образованием различных наноструктур, поскольку такие материалы биосовместимы, обладают повышенной термостабильностью и рядом других уникальных физических свойств.

Основными способами получения структур на основе олигопептидов являются кристаллизация из растворов с одним или двумя растворителями, термическая обработка порошков и пленок, а также обработка аморфных пленок олигопептидов различными парами. При этом результат самосборки или самоорганизации может зависеть как от структурных особенностей самих олигопептидов, так и от внешних параметров. Однако имеющихся в литературе на сегодняшний день теоретических и экспериментальных знаний о поведении олигопептидов при самосборке и самоорганизации и влиянии на эти процессы различных факторов недостаточно для рационального дизайна и точного контроля типа формирующихся наноструктур. Крайне редко учитывается возможное присутствие в жидких растворителях или их парах воды, которая может оказать критическое влияние на самосборку.

В настоящей работе для изучения результатов самосборки короткоцепных олигопептидов и свойств структур на их основе был использован метод атомно-силовой микроскопии, который является прямым инструментом исследования поверхностных свойств различных объектов и материалов и позволяет получать изображения поверхности образцов с высоким разрешением.

Цель работы состояла в поиске и определении условий для направленной самосборки короткоцепных олигопептидов (ди- и трипептидов) с образованием наноструктур и кристаллов, обладающих практически полезными свойствами.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследовать влияние природы подложек на формирование наноструктур на поверхности пленок ди- и трипептида на основе глицина под действием паров органических соединений и воды.
2. Исследовать влияние воды и природы паров органических соединений, а также количества аминокислотных остатков в молекуле олигопептида, на самосборку ди- и трипептида на основе глицина в тонких пленках.
3. Изучить механизм формирования кристаллических наноструктур на основе глицил-глицина.
4. Исследовать влияние порядка следования аминокислотных остатков в дипептидах, содержащих фенилаланин и лейцин, на тип формирующихся структур и их свойства.
5. Изучить физические свойства полученных наноструктур на основе олигопептидов методами сканирующей зондовой микроскопии, включая атомно-силовую спектроскопию и силовую микроскопию пьезоотклика.

Научная новизна результатов работы

1. Впервые методом атомно-силовой микроскопии проведено изучение процессов самосборки дипептида глицил-глицин и трипептида глицил-глицил-глицин в тонких пленках, нанесенных на поверхность гидрофильного и гидрофобного кремния, под действием паров органических соединений.
2. Впервые с помощью атомно-силовой микроскопии проведено исследование взаимного влияния типа подложки (слода и высокоориентированный пиролитический графит и паров органических соединений на самосборку дипептида глицил-глицин и трипептида глицил-глицил-глицин в твердой фазе.
3. Впервые комплексом экспериментальных и теоретических методов проведено изучение механизма самосборки дипептида глицил-глицин в присутствии паров воды и органических соединений.
4. Впервые продемонстрированы пьезоэлектрические свойства структур на основе дипептидов L-лейцил-L-фенилаланин и L-фенилаланил-L-лейцин.

Теоретическая значимость

В работе сформулированы общие принципы применения различных типов органических соединений для направленной самосборки олигопептидов в тонких пленках, нанесенных на подложки с различными поверхностными свойствами. Предложен возможный механизм формирования кристаллических структур олигопептидов на поверхности аморфных пленок под действием паров органических соединений, установлена критическая роль воды в этом процессе. Приведен способ использования параметров растворимости Хансена для предсказания возможного влияния паров органических соединений на морфологию аморфных пленок олигопептидов.

Практическая значимость

В работе впервые проведено комплексное исследование влияния паров воды и органических соединений, а также природы подложек на морфологию поверхности тонких пленок ряда короткоцепных олигопептидов. Продemonстрированы пьезоэлектрические свойства микрокристаллов дипептидов L-лейцил-L-фенилаланин и L-фенилаланил-L-лейцин. Полученные результаты могут быть использованы при разработке подходов для управляемой самосборки олигопептидов, с целью получения новых биосовместимых материалов и экологически чистых микро- и наноустройств для решения задач медицины, экологии, энергетики.

Методология и методы исследования

Для характеристики морфологии пленок на основе олигопептидов использованы атомно-силовая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия. Атомно-силовой микроскоп, работающий в режиме атомно-силовой спектроскопии, применялся для оценки сил адгезии. Пьезоэлектрические свойства были исследованы с помощью силовой микроскопии пьезоэлектрического отклика. Порошковая рентгеновская дифрактометрия была использована для оценки кристалличности образующихся нано- и микроструктур. Для определения свойств исследуемых образцов использовались: анализ динамического

рассеяния света, измерения ζ -потенциала, спектроскопия комбинационного рассеяния света. Для теоретических расчетов и установления оптимальной геометрии изучаемых молекул в газовой фазе применяли квантово-химические расчеты.

Положения, выносимые на защиту:

1. Ключевая роль материала и степени гидрофобности подложки в процессе самосборки ди- и трипептида на основе глицина в аморфные пленки.
2. Управляемость процесса самосборки ди- и трипептида глицина и формирования кристаллических структур на их основе с различной морфологией под действием паров органических соединений в присутствии воды с использованием различных комбинаций «подложка и органический компонент».
3. Механизм формирования кристаллических структур на основе глицил-глицина на поверхности аморфных пленок под действием паров органических соединений в присутствии воды с определяющей стадией перехода молекул дипептида из нейтральной (аморфная пленка) в цвиттер-ионную форму (кристаллическая структура), стабилизируемую молекулами воды.
4. Пьезоэлектрические свойства пленок на основе дипептидов L- фенилаланил-L-лейцина и L-лейцил-L-фенилаланин.

Личный вклад автора

В диссертации представлены результаты, в получении и интерпретации которых автору принадлежит определяющая роль. Вклад диссертанта состоит в разработке методик получения аморфных пленок и микро- и наноструктур на основе олигопептидов, а также в проведении экспериментов по изучению их свойств, обработке и анализе экспериментальных результатов, их интерпретации и обсуждении. Постановка задач исследований осуществлялась научным руководителем.

Структура работы

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка авторской литературы и списка использованных источников, включающего 110 наименований. Объем диссертации насчитывает 121 страниц машинописного текста, включая 63 рисунка и 4 таблицы.

Работа выполнена в лаборатории физики и химии поверхности Казанского физико-технического института им. Е.К. Завойского – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ КазНЦ РАН) в рамках тематических планов научно-исследовательских работ ФИЦ КазНЦ РАН по государственному заданию Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № АААА-А18-118041760011-2, № 122011800132-52, а также при поддержке гранта РФФИ № 20-32-90101.

Степень достоверности полученных результатов обусловлена использованием современных методов исследования и современного оборудования для получения

экспериментальных данных. Результаты работы не противоречат и дополняют ранее полученные данные других авторов.

Апробация результатов. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на II Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века», г.Казань (2016), Международной молодежной научной школе «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия», г.Казань (2016,2017,2019), Международной научной конференции «Сканирующая зондовая микроскопия», г.Екатеринбург, УрФУ (2017-2019,2022), Международной конференции молодых ученых International conference Physica.SPb/2017, г.Санкт-Петербург (2017), Международном симпозиуме «Нанопизика и наноэлектроника», г. Нижний Новгород (2019-2023), Российской конференции по электронной микроскопии, г.Черноголовка (2020,2022), Объединенной конференции «Электронно-лучевые технологии и рентгеновская оптика в микроэлектронике», г.Черноголовка (2021).

Публикации

Результаты работы опубликованы в 22 печатных работах, из них 4 статьи в рецензируемых российских и зарубежных научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов кандидатских диссертаций [A1-A4], и 18 тезисов докладов в материалах конференций и симпозиумов различного уровня [A5-A22].

Содержание работы

Во введении дана общая характеристика диссертационной работы, обоснование актуальности темы диссертации, формулируются цель работы и основные положения, выносимые на защиту. Дается обоснование новизны и практической значимости полученных результатов, приведены структура и краткое содержание диссертации. Описан личный вклад автора, апробация работы, приведены сведения о публикациях по материалам диссертации.

В первой главе приведен краткий литературный обзор по теме исследования. Представлены сведения об олигопептидах и их свойствах. Описываются методы формирования наноструктур на основе олигопептидов за счет их самоорганизации и самосборки: получение наноструктур из растворов олигопептидов в различных растворителях [1] и формирование наноструктур в тонких пленках [2]. Далее в главе обсуждаются факторы, влияющие на самоорганизацию и самосборку олигопептидов, такие как: тип, количество и порядок следования аминокислотных остатков, входящих в состав олигопептида [3] и др. Заключительная часть первой главы посвящена актуальности исследования олигопептидов и перспективам применения биосовместимых материалов в различных технологиях.

Во второй главе описываются экспериментальные методы и установки, использованные в ходе работы над диссертацией. Приводятся описание объектов,

использованных в работе, методик получения аморфных пленок олигопептидов и насыщения таких пленок парами органических соединений.

В качестве объектов исследования были использованы глицил-глицин (GlyGly) (Chem-Impex International, #00165) и глицил-глицил-глицин (GlyGlyGly) (Chem-Impex International, #04555), *L*-фенилаланил-*L*-лейцин (PheLeu) (Bachem Lot#: 4000130), *L*-лейцил-*L*-фенилаланин (LeuPhe) (Bachem Lot#: 4000185), органические растворители марки «для ГХ» с чистотой $\geq 99,9\%$. Олигопептиды и органические растворители использовали без дополнительной очистки. Структурные формулы олигопептидов представлены на рис.1.

Для получения пленок GlyGly и GlyGlyGly использовались растворы с концентрацией 1 мг/мл, приготовленные растворением точной навески в смеси метанола-вода (в соотношении 1:1). Растворы дипептидов PheLeu и LeuPhe (концентрация 1 мг/мл) готовились растворением точной навески дипептида в метаноле или гексафторизопропанол (ГФИП) (концентрация 0.4 мг/мл). Пленки олигопептидов получали путем нанесения определенного объема раствора олигопептида на поверхность подложек с последующим испарением растворителя. В качестве подложек использовались высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ), слюда и монокристаллический кремний.

Для насыщения пленок олигопептидов парами органических соединений подложку с нанесенной пленкой помещали в чашку Петри, содержащую 200 мкл или 400 мкл органического растворителя. Чашку Петри герметизировали и выдерживали при комнатной температуре в течение определенного времени в зависимости от условий эксперимента.

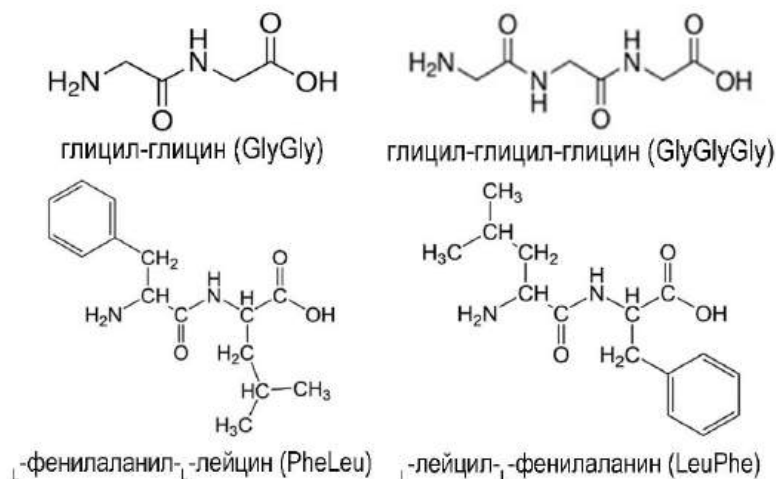


Рисунок 1 – Структурные формулы олигопептидов.

Третья глава посвящена результатам исследования и разделена на 4 раздела.

В разделе 3.1 представлены результаты исследования влияния подложки на морфологию поверхности пленок GlyGly и GlyGlyGly. Для формирования пленок были использованы различные подложки: гидрофобный ВОПГ, слюда, свежий скол которой несет отрицательный заряд, и монокристаллический кремний, поверхность которого в зависимости от обработки может быть гидрофильной или гидрофобной. Морфологию

пленки GlyGly, полученной на различных подложках, охарактеризовали с помощью АСМ, рис.2.

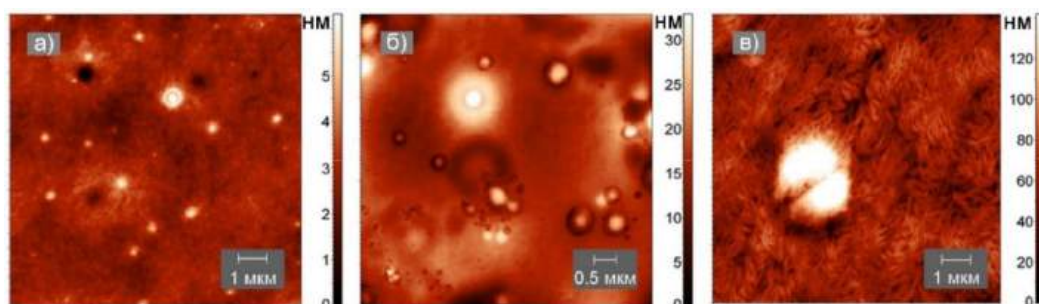


Рисунок 2 – АСМ изображения пленок GlyGly, нанесенных на ВОПГ (а), слюду (б) и кремний (в) из раствора вода/метанол с концентрацией 1 мг/мл [A1, A2].

На поверхности ВОПГ и слюды формируются аморфные пленки без кристаллических объектов, рис.2а, б. На кремниевых пластинах происходит кристаллизация GlyGly с образованием мелких объектов с зауженным концом длиной 200–600 нм, рис.2в. Наблюдаемое влияние подложки на морфологию пленки может быть обусловлено несколькими причинами, рис. 3 [A1].

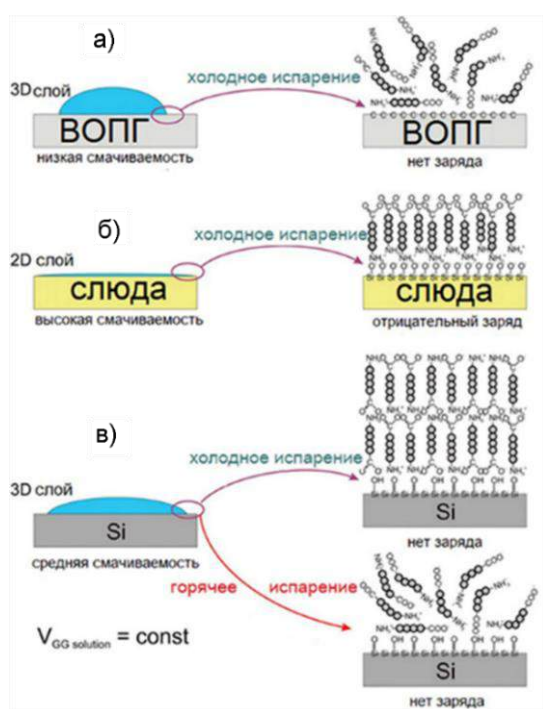


Рисунок 3 – Схема возможной организации молекул GlyGly на различных поверхностях.

Хаотическое расположение молекул дипептида, характерное для аморфной пленки, на поверхности ВОПГ, рис.3а, обусловлено отсутствием сильных взаимодействий между ВОПГ и GlyGly. Отрицательный заряд на поверхности слюды обеспечивает ее хорошую смачиваемость, образование двумерной пленки и препятствует свободному перемещению молекул GlyGly в цвиттер-ионной форме из-за сильного электростатического взаимодействия, рис.3б. На поверхности кремниевой пластины имеются оксиды и гидроксильные группы, способные эффективно адсорбировать молекулы дипептида и ориентировать их в пространстве, что приводит формированию кристаллов, рис.3в.

Аналогичные результаты были получены для трипептида GlyGlyGly.

Для направленной самосборки олигопептидов необходимы аморфные пленки, так как они обладают избыточной энергией по сравнению с кристаллическими структурами [A1]. Обработка таких пленок парами органического соединения приводит к формированию на их поверхности микро- и наноструктур [4]. Поэтому была разработана методика получения аморфных пленок GlyGly и GlyGlyGly на поверхности кремниевой

подложки, заключающаяся в обдуве теплым воздухом (45°C) раствора олигопептида, нанесенного на кремний, рис. 3в [A1, A2].

Раздел 3.2 посвящен результатам исследования влияния паров органических соединений на самосборку олигопептидов в тонкой пленке. Аморфные пленки GlyGly и GlyGlyGly, нанесенные на различные подложки, насыщали парами органических соединений с термодинамической активностью $P/P_0 = 1$ в герметичных системах не менее 1 часа. Для насыщения пленок олигопептидов парами использовались растворители, относящиеся к разным классам органических соединений.

Установлено, что результат самосборки пленок GlyGly и GlyGlyGly под действием паров органических соединений и воды зависит от типа подложки. Насыщение пленок GlyGly, нанесенных на поверхности ВОПГ, слюды и кремния, парами сильных протонодоноров метанола или этанола во всех случаях приводило к образованию пластинчатых кристаллов, характерных для α -фазы GlyGly [5], рис.4.

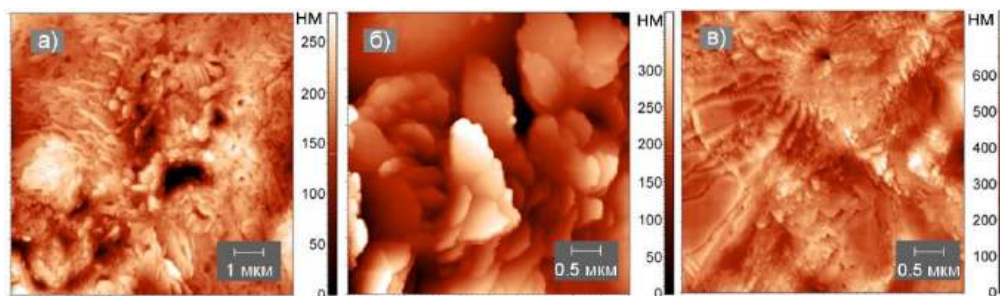


Рисунок 4 – АСМ изображения пленки GlyGly, нанесенной на ВОПГ (а), слюду (б) и кремний (в) после насыщения парами этанола [A1].

Структуры GlyGly, сформированные на кремниевой подложке после насыщения парами этанола, были охарактеризованы с помощью СЭМ, рис.5. Обнаружены складчатые, длиной до 36 мкм, рис.5а, и дендритные структуры диаметром более 80 мкм, рис.5б [A1].

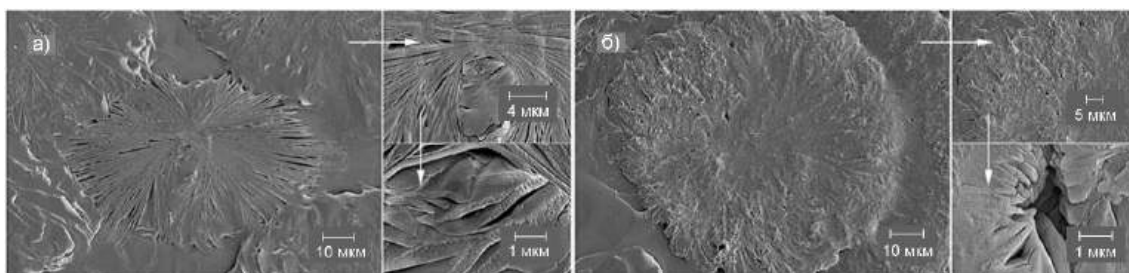


Рисунок 5 – СЭМ-изображения двух мест (а, б) пленки GlyGly, нанесенной на кремний, после насыщения парами этанола, с разным увеличением.

После взаимодействия пленки GlyGlyGly, нанесенной на ВОПГ, с парами этанола происходит ее самосборка с формированием кристаллов длиной до 450 нм и шириной 118–370 нм, рис.6а. В то время как после насыщения парами воды образуются протяженные кристаллы длиной до 40 мкм и высотой до 70 нм, рис.6б.

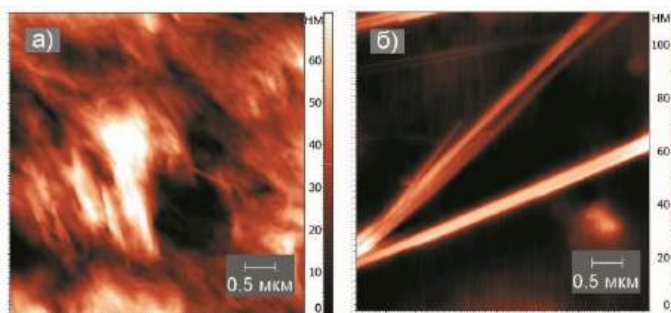


Рисунок 6 – АСМ изображения пленок GlyGlyGly, нанесенных на ВОПГ (а, б), после насыщения парами этанола (а) и воды (б).

Формирование аморфной пленки и кристаллических структур после ее насыщения подтверждено методом порошковой рентгеновской дифрактометрии, рис.7.

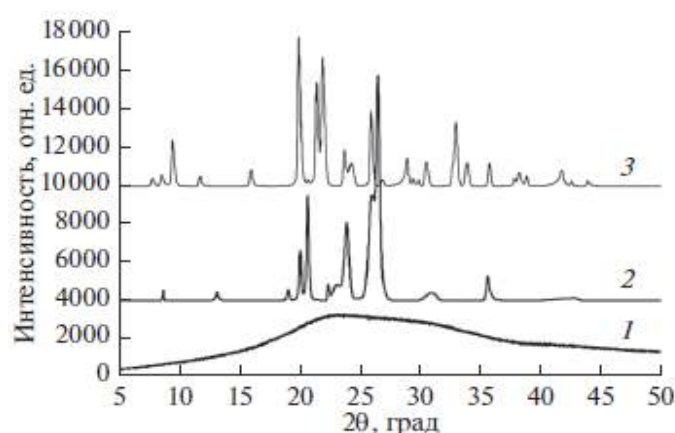


Рисунок 7 – Дифрактограммы пленки GlyGlyGly, полученной на поверхности ВОПГ при быстром испарении растворителя (кривая 1), пленки GlyGlyGly после насыщения парами этанола (кривая 2) и парами воды (кривая 3).

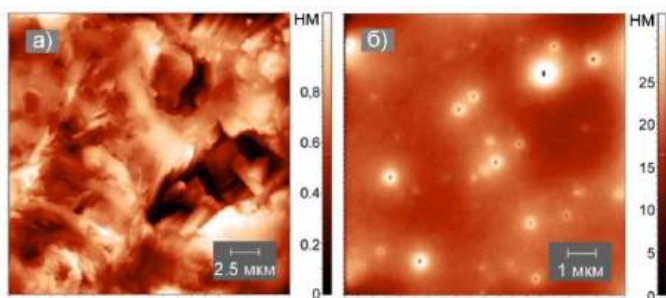


Рисунок 8 – АСМ изображения морфологии пленки GlyGly, нанесенной на ВОПГ (а), слюду (б) после насыщения парами ацетонитрила.

При использовании паров слабых протонодоров или протоноакцепторов, неспособных к образованию сильных водородных связей с олигопептидами, тип подложки оказывает драматическое влияние. Самособорка пленки GlyGly под действием паров слабого протоноакцептора ацетонитрила наблюдается на

поверхности ВОПГ, рис.8а, в то время как слюда препятствует этому процессу, рис.8б.

После насыщения парами ацетонитрила пленки GlyGly кристаллические структуры были обнаружены на поверхности как гидрофильного, рис.9а, так и гидрофобного кремния, рис.9б. При увеличении размера молекулы от ди- к трипептиду самособорка пленки GlyGlyGly отсутствует уже на поверхности гидрофильного кремния рис.9в.

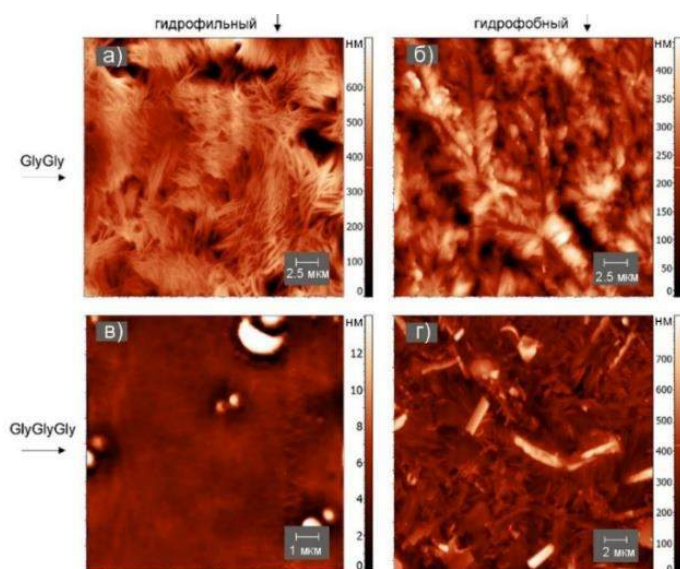


Рисунок 9 – АСМ изображения пленок (а, б) GlyGly и (в, г) GlyGlyGly на гидрофильном (а, в) и (б, г) гидрофобном кремнии после насыщения парами ацетонитрила [A3].

подложке, рис.9в, $F_{\text{адг}} \approx 160$ нН. На гидрофобной подложке по данным АСМ наблюдается формирование кристаллов трипептида, рис.9г, и величина силы адгезии значительно уменьшается – ≈ 50 нН [A3]. Полученные результаты демонстрируют возможность применения метода АСМ для определения степени кристалличности наноструктур на основе олигопептидов на наноуровне.

Процесс кристаллизации пленки GlyGly при постоянной температуре, вероятно, состоит из нескольких стадий, рис.10. На первой стадии – адсорбция молекул органического соединения из паровой фазы на поверхности пленки. На второй стадии – конденсация органического растворителя. Далее пленка частично растворяется в сконденсированных каплях с образованием насыщенного раствора. Это инициирует самосборку олигопептида в зародыши, а затем и в кристаллы.

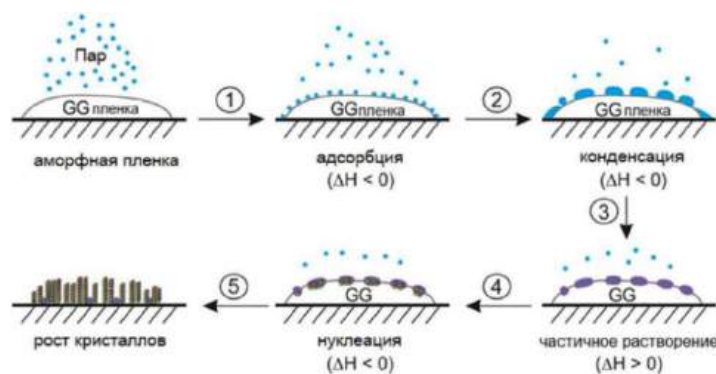


Рисунок 10 – Схема возможного механизма самосборки GlyGly в аморфной пленке, инициируемой паром [A1].

Для GlyGlyGly на поверхности гидрофобного кремния зафиксированы как волокнообразные структуры, так и хорошо очерченные кристаллы длиной от 1 мкм до 3.5 мкм, рис.9г.

Методом атомно-силовой спектроскопии (АСС) были исследованы адгезионные свойства и рассчитана сила адгезии $F_{\text{адг}}$ полученных микро- и наноструктур к зонду. Для аморфных пленок GlyGly и GlyGlyGly вне зависимости от типа подложки $F_{\text{адг}}$ составляет ≈ 100 – 120 нН. После насыщения парами ацетонитрила пленки GlyGlyGly на гидрофильной

Процессы (1) и (2) сопровождаются выделением энергии, достаточной для протекания эндотермического [6] процесса (3). Зарождение (4) и рост кристаллов (5) благоприятны с точки зрения термодинамики из-за перехода аморфного состояния с избыточной энергией [7] в более стабильное состояние. Лучшая растворимость

аморфного состояния по сравнению с кристаллическим состоянием [8] обеспечивает смещение равновесия в процессе (3) в сторону образования зародышей (4).

Для объяснения различия влияния органических растворителей на кристаллизацию аморфной пленки дипептида были использованы параметры растворимости Хансена (HSP), характеризующие свойства растворителя. Эти параметры включают в себя дисперсионную (δ_D), полярную (δ_P), водородную (δ_H) составляющие [9]. Обнаружена корреляция между параметром δ_P и влиянием паров органических соединений на морфологию поверхности тонкой пленки дипептида. Исследуемые растворители можно разделить на две группы, рис.11.

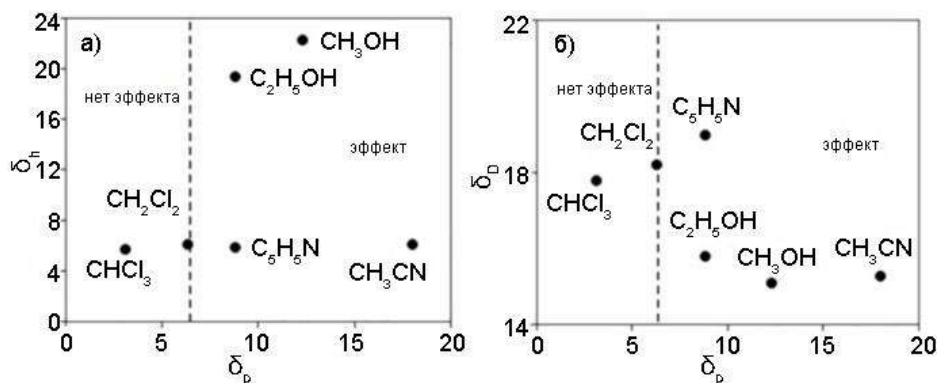


Рисунок 11 – Соотношения между параметрами Хансена для исследованных органических растворителей: (а) δ_H от δ_P и (б) δ_D от δ_P . [A1].

Растворители со значением $\delta_P > 6$ могут инициировать кристаллизацию аморфной пленки дипептида на поверхности ВОПГ и кремния. Тогда как слюда препятствует действию даже ацетонитрила с $\delta_P = 18$ (без изменений морфологии) и пиридина $\delta_P = 8.8$ (небольшие изменения морфологии). По-видимому, в этом случае важна способность растворителей образовывать водородные связи в качестве доноров протонов. Следует отметить, что хлороформ с $\delta_P = 3.1$ ($\delta_P < 6$) оказывает незначительное влияние на морфологию пленки дипептида. Вероятно, это связано с наличием следов воды в хлороформе, что может привести к существенному изменению свойств среды [10]. Обнаруженная связь между результатами АСМ и параметрами Хансена позволяет предположить, что растворители с $\delta_P = 0$ не будут влиять на морфологию пленки GlyGly. В то же время взаимодействие с парами воды $\delta_P = 16$ должно приводить к сильным изменениям морфологии.

Раздел 3.3 посвящен результатам исследования влияния воды на самосборку GlyGly в присутствии паров ряда органических соединений, таких как протонодонорный хлороформ (CHCl_3), апротонные растворители дихлорметан (CH_2Cl_2) и тетрахлорметан (CCl_4), а также гидрофобный бензол (C_6H_6). С помощью АСМ было установлено, что при влажности воздуха близкой к 0% взаимодействие аморфных пленок GlyGly с парами этих соединений не приводит к формированию упорядоченных структур. Была исследована морфология поверхности пленок GlyGly после насыщения смесью паров органических соединений и воды в соотношении 20:1 по объему (40:1 для дихлорметана) в течение различного времени. Установлено, что кристаллизация аморфной пленки GlyGly происходит только при наличии паров воды в системе и зависит от используемого для

насыщения пара и времени насыщения, рис. 12 Скорость самосборки GlyGly при взаимодействии с парами смеси C_6H_6/H_2O и CCl_4/H_2O выше, чем в системе со смесями CH_2Cl_2/H_2O и $CHCl_3/H_2O$ [A4].

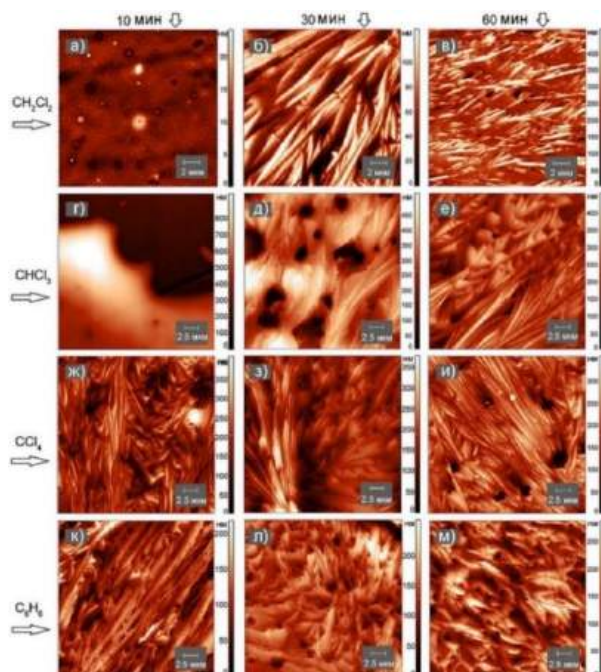


Рисунок 12 – АСМ изображения поверхности пленок GlyGly после насыщения в течение 10 мин (а, г, ж, к), 30 мин (б, д, з, л) и 60 мин (в, е, и, м) парами смеси органическое соединение (а, б, в) CH_2Cl_2 , (г, д, е) $CHCl_3$, (ж, з, и) CCl_4 и (к, л, м) C_6H_6 и вода (20:1 по объему растворитель : вода, 40:1 для дихлорметана).

Было предположено, что важную роль в процессе самосборки играет растворимость дипептида в используемых растворителях, поскольку стадия образования раствора в сконденсированных каплях предшествует процессам самосборки согласно схеме на рис.10. Для качественной оценки растворимости дипептида 4 мг GlyGly смешивали с 300 мкл растворителя, за исключением CH_2Cl_2 , который дипептид не растворял. Через 24 ч полученные растворы использовали для приготовления пленок.

Размер нерастворившихся частиц, присутствующих на поверхности пленок, оценивали методом АСМ, табл.1 [A4].

Установлено уменьшение растворимости дипептида GlyGly в ряду $H_2O > C_6H_6 > CHCl_3 > CCl_4 > CH_2Cl_2$, так как размер частиц увеличивается в том же порядке, табл.1.

Таблица 1. Данные о размерах частиц GlyGly и расстоянии между ними по данным АСМ.

Растворитель	Размер частиц, мкм	Средний размер частиц, мкм	Расстояние между частицами, мкм	Среднее расстояние между частицами, мкм	Масса частиц дипептида в растворе, мг
H_2O	0.1-0.3	0.2	0.5-1	0.8	~0,00006
C_6H_6	0.3-0.5	0.4	0.8-2	1.4	~0,00016
$CHCl_3$	0.6-1.2	0.9	0.5-3	1.8	~0,00113
CCl_4	0.8-1.3	1.1	1.5-3	2.3	~0,01125

Используя программное обеспечение для анализа данных АСМ, был рассчитан средний объем частиц на поверхности подложки и, учитывая плотность кристаллов GlyGly (1.5 г/мл), было оценено количество нерастворившегося дипептида в C_6H_6 , CCl_4

или CHCl_3 , табл. 1. Таким образом, метод АСМ был использован для количественного определения растворимости органических веществ.

Было обнаружено, что нерастворившиеся частицы GlyGly располагаются на поверхности пленки на определенном расстоянии друг от друга, табл. 1. Методом динамического рассеяния света установлено, что водный раствор GlyGly содержит частицы GlyGly со средним гидродинамическим диаметром 155 нм, что хорошо согласуется с данными АСМ, табл. 1. Среднее значение ζ -потенциала частиц составило -27,4 мВ. То есть, взаимное отталкивание частиц обеспечивает их равномерное распределение на подложке.

Для установления механизма влияния паров воды на самосборку дипептида были использованы методы комбинационного рассеяния света (КРС) и квантово-химических расчетов (КХР). В спектре КРС, полученном для раствора GlyGly в CCl_4 , наблюдается широкий пик при 1268 см^{-1} , рис.13, спектр а, соответствующий угловому изгибу группы $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ [11] или колебанию группы $-\text{O}-\text{H}$ [12]. Такой же пик присутствует в спектре, полученном для аморфной пленки, рис.13, спектр б. В спектре КРС кристаллических структур, полученных после насыщения аморфной пленки GlyGly смесью $\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$ в течение суток, рис.13, спектр в, наблюдаются пики, характерные для ионизированных $-\text{COO}^-$ (1406 см^{-1} и 1562 см^{-1}) [13] и $-\text{NH}_3^+$ (1658 см^{-1}) групп [14]. Полученные данные показывают, что в растворе в CCl_4 и в аморфной пленке GlyGly находится преимущественно в молекулярной форме, а в кристаллах, сформированных после воздействия паров воды и органического растворителя, присутствует цвиттер-ионная форма дипептида [А4].

С помощью КХР установлено, что выигрыш в энергии цвиттер-ионной формы по сравнению с молекулярной формой GlyGly составляет $-592.6 \text{ кДж моль}^{-1}$, рис.14. Поэтому достаточно небольшого внешнего воздействия для перехода молекулярной формы GlyGly в цвиттер-ионную форму, которая далее легко кристаллизуется [15]. Кроме того, цвиттер-ионная форма дипептида стабилизируется 8 молекулами воды, которые выступают в роли агентов, ионизирующих молекулы дипептида.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

(1) Самосборка дипептида GlyGly инициируется парами воды, присутствующими в парах органических растворителей.

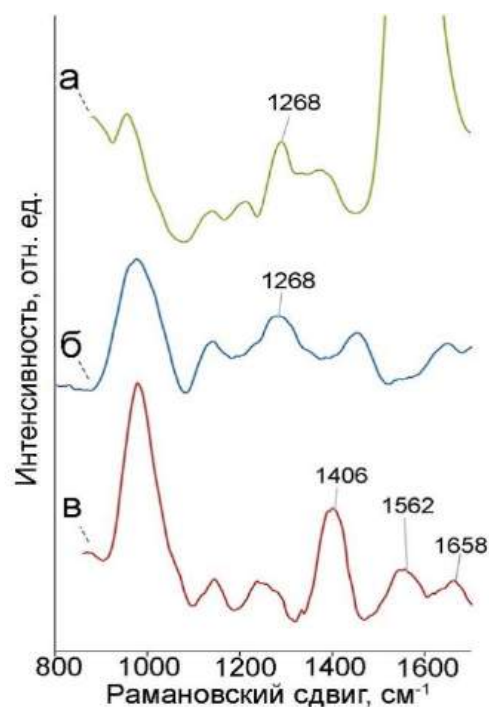


Рисунок 13 – Спектры комбинационного рассеяния света (а) раствора GlyGly в CCl_4 , (б) аморфной пленки GlyGly, (в) пленки после насыщения смесью паров $\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$.

(2) Процессу кристаллизации дипептида предшествует стадия образования насыщенного раствора дипептида в сконденсированных парах.

(3) Молекулы воды инициируют образование и стабилизируют цвиттер-ионную форму дипептида, участвующего в формировании кристаллов.

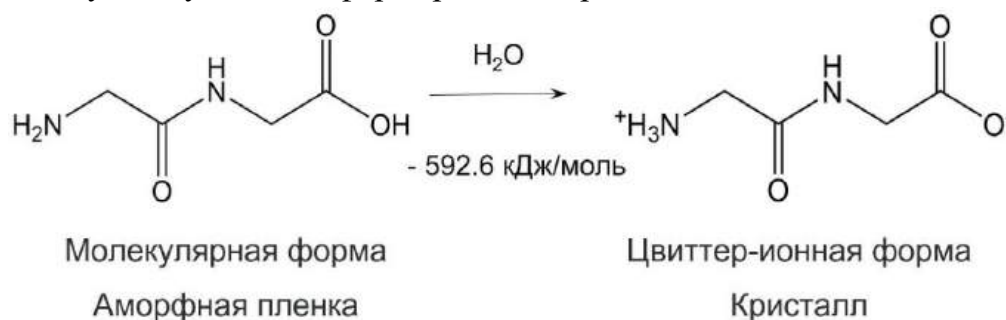


Рисунок 14 – Схема перехода молекулярной формы молекулы дипептида в цвиттер-ионную форму.

Раздел 3.4 посвящен результатам исследования влияния порядка следования аминокислотных остатков в L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин на их самосборку, а также пьезоэлектрические свойства полученных наноструктур.

Установлено, что из раствора в CH_3OH при использовании метода вращающейся подложки (МВП) на кремниевой пластине дипептид LeuPhe образуются мелкие шарообразные структуры. При насыщении пленки LeuPhe парами CH_3OH в течение 60 мин на поверхности формируются крупные кристаллы высотой около 300 нм, рис.15а.

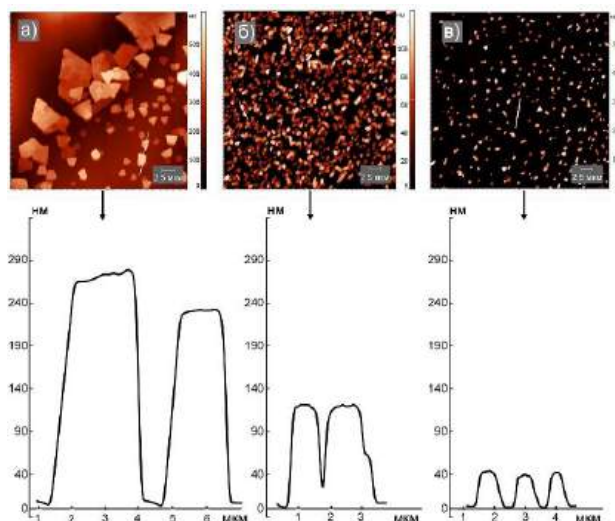


Рисунок 15 – АСМ изображения пенек LeuPhe из раствора в MeOH на кремневой подложке, после насыщения парами MeOH в течении 60 мин (а), 30 мин (б), 10 мин (в).

Была продемонстрирована возможность контроля размеров кристаллов путем изменения времени насыщения, рис.15. Взаимодействие пленки с парами в течение 30 мин приводит к образованию структур высотой до 100 нм, рис.15б. Через 10 мин - высотой до 60 нм, рис.15в. То есть, предложенную методику можно использовать для контроля размеров кристаллических структур на основе дипептида LeuPhe.

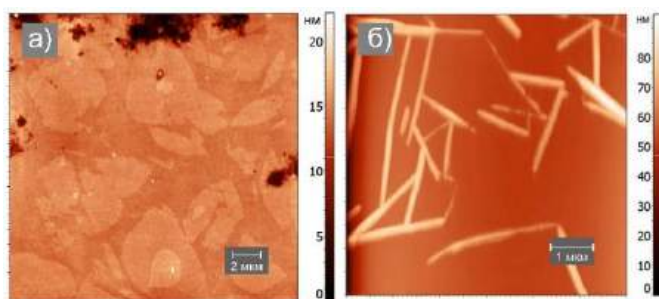


Рисунок 16 – АСМ изображения пенки PheLeu из раствора в MeOH на кремневой подложке, полученные методом вращающейся подложки (а), после насыщения парами MeOH (б).

С помощью силовой микроскопии пьезоотклика (СМПО) были проведены исследования кристаллических наноструктур на основе PheLeu и LeuPhe.

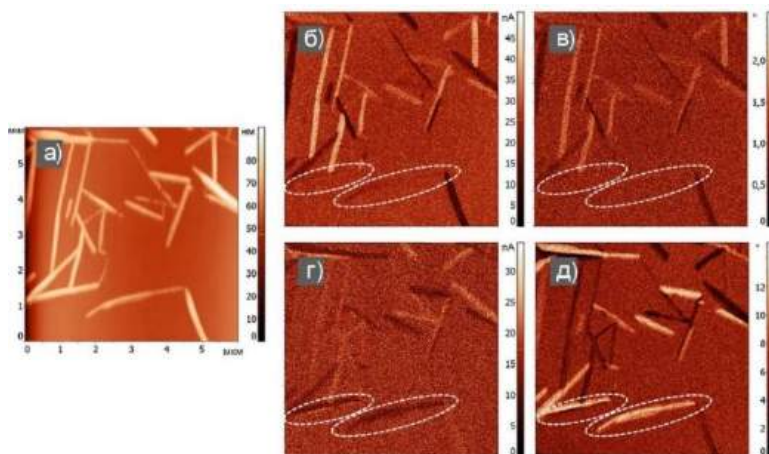


Рисунок 17 – СЗМ изображения кристаллических структур PheLeu, полученных на кремневой подложке после насыщения парами MeOH: (а) топография, (б, г) амплитудные, (в, д) фазовые, изображения при вертикальных (б, в) и латеральных (г, д) измерениях.

При использовании МВП на поверхности кремния были получены протяженные участки PheLeu, площади которых заметно различаются, рис.16а. После насыщения парами CH_3OH в течение суток на поверхности пленки дипептида PheLeu сформировались кристаллы длиной до 3 мкм, рис.16б.

На рис.17 приведены АСМ изображения кристаллических структур PheLeu, полученные в режимах: топографии, рис.17а; изменения амплитуды и фазы вертикальных, рис.17б, в, и горизонтальных, рис.17г, д, колебания кантилевера при измерении СМПО сигнала соответственно.

Обнаружено, что наноструктуры PheLeu проявляют пьезоэлектрические свойства.

Установлено, что для большинства структур пьезосигнал присутствует как на изображениях, отвечающих за вертикальные колебания, рис.17б, в, так и горизонтальные колебания, рис.17г, д. Величина разброса СМПО сигнала на амплитудных изображениях примерно одинакова и составляет 50 пА для вертикальных колебаний, рис.17б, и 35 пА для горизонтальных колебаний, рис.17г. То есть вектор поляризации пьезоэлектрических доменов находится под углом к поверхности.

Кристаллы LeuPhe, сформированные на поверхности пленки после насыщения парами CH_3OH , также проявляют пьезоэлектрические свойства, рис.18. Величина разброса СМПО сигнала на амплитудных изображениях сильно различается.

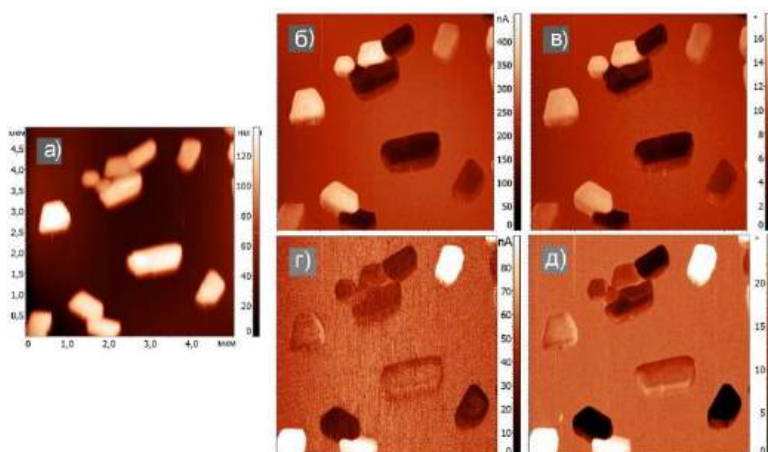


Рисунок 18 – Кристаллы LeuPhe, полученные на кремниевой подложке после насыщения парами MeOH: (а) топография, (б, г) амплитудные, (в, д) фазовые, изображения при вертикальных (б, в) и латеральных (г, д) измерениях.

Для вертикальных колебаний, рис.18б, разброс составляет 450 пА, а для горизонтальных колебаний, рис.18г, более чем в 5 раз меньше и составляет 80 пА. То есть векторы поляризации направлены преимущественно вертикально к поверхности, в отличие от кристаллов PheLeu.

Таким образом, с помощью СМПО впервые продемонстрированы

пьезоэлектрические свойства структур на основе дипептидов PheLeu и LeuPhe. Обнаруженные пьезоэлектрические свойства кристаллов на основе PheLeu и LeuPhe открывают перспективные пути их использования для разработки сенсорных устройств, особенно для применения в биомедицинских областях.

В заключении перечислены основные результаты и выводы:

1. Установлено, что в результате воздействия паров сильных протонодоноров (этанол и метанол) и протоноакцептора пиридина на поверхности пленок глицил-глицина и глицил-глицил-глицина происходит формирование различных микро- и наноструктур вне зависимости от типа используемой подложки. Форма образующихся структур зависит от природы паров органических соединений, используемых для насыщения пленок. Пары органических соединений, неспособных к образованию водородных связей, не оказывают влияния на морфологию аморфных пленок.

2. При воздействии паров слабого протонакцептора ацетонитрила на тонкие пленки глицил-глицина и глицил-глицил-глицина существенное влияние на результат самосборки оказывает количество аминокислотных остатков в молекулах олигопептидов, а также степень гидрофобности используемой подложки.

3. Методом атомно-силовой спектроскопии установлено, что адгезионные взаимодействия на поверхности аморфной пленки и кристаллических наноструктур различно, что позволяет проводить картирование поверхности, с целью установления границ аморфных и кристаллических областей.

4. Впервые проведено комплексное исследование взаимного влияния паров воды и органических соединений, неспособных к формированию водородных связей, на самосборку дипептида GlyGly в твердом состоянии. Установлена ключевая роль паров воды при кристаллизации GlyGly под действием паров дихлорметана, хлороформа, тетрахлорметана и бензола.

5. Впервые предложен механизм самосборки дипептида GlyGly в присутствии паров воды и органических соединений, объясняющий источник энергии, необходимый для перестройки фазы олигопептида.

6. Предложен подход для применения атомно-силовой микроскопии для качественной оценки растворимости дипептидов в органических средах и воде.

7. Впервые продемонстрированы пьезоэлектрические свойства наноструктур на основе дипептидов LeuPhe и PheLeu. Обнаруженные особенности этих структур открывают перспективные пути их использования для разработки сенсорных устройств, особенно для использования в биомедицинских областях.

Цитируемая литература:

1. Yuran S., et al. // *Acs Nano*. 2016. V.6. P. 9559.
2. Tao K., et al. // *Science*. 2017. V. 358. P. 1-7.
3. Ziganshin M.A., et al. // *PCCP*. 2015. V. 17. P.20168-20177.
4. Ryu J., Park C. B. // *Biotechnol. Bioeng.* 2010. V.105. P.221-230.
5. Hughes E. W., Moor W. J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1949. V.71. P.2618-2623.
6. Hirata M., et al. // Tokyo: Kodansha Limited. 1975.
7. Smirnov V. I., Badelin V. G. // *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2017. V.91. P.1681.
8. Babu N. J., Nangia A. // *Cryst. Growth Des.* 2011. V.11. P. 2662.
9. Hansen C. New York: CRC Press Taylor & Francis Group. 2007.
10. Safiullina A. S., et al.// *Soft Matter*. 2019. V.15. P.3595.
11. Hernández B., et al // *Chem. Phys.* 2013. V. 425. P. 104-113.
12. Baran J., et al. // *J. Mol. Struct.* 2012. V. 1009. P.55-68.
13. Holtz, J. S. W., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. P. 3762-3766.
14. Sjöberg, B., et al. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. V. 128. P.300-311.
15. Bernal J. D. // *Z. Kristallogr. Cryst. Mater.* 1931. V. 78. P. 363.

Список публикаций автора по теме диссертации

Статьи в журналах:

[A1] Ziganshin M., **Morozova A.**, Ziganshina S. et al. Additive and antagonistic effects of substrate and vapors on self-assembly of glycyl-glycine in thin films // *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2019. V. 690. P. 67-83.

[A2] **Morozova A.**, Ziganshina S., Bukharaev A. et al. Features of the Self-organization of Films Based on Triglycine under the Influence of Vapors of Organic Compounds // *J. of Sur. Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*. 2020. V. 14. P. 499-506.

[A3] **Morozova A.**, Ziganshina S., Ziganshin M. et al. Self-organization of di- and triglycine oligopeptides in thin films on the hydrophilic and hydrophobic silicon surface under exposure to organic compounds vapors // *Russ. J. of Gen. Chem.* 2022. V. 92. P. 1271-1279.

[A4] **Morozova A.**, Ziganshina S., Kudryavtseva E. et al. Water admixture triggers the self-assembly of the glycyl-glycine thin film at the presence of organic vapors // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2022. V. 649. P. 129541.

Статьи в сборниках по материалам конференций и тезисы докладов:

[A5] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Самосборка короткоцепных олигопептидов с образованием микро-и нано объектов и их свойства по данным СЗМ. XXVII Международный симпозиум «Нанопизика и наноэлектроника». 2023, 395-396.

[A6] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Самосборка дипептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин по данным атомно-силовой микроскопии // КФТИ им. Е.К Завойского. Ежегодник. 2022, 36-39.

[A7] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Самосборка тонкой пленки глицил-глицина в присутствии органических паров. XXIX Российская конференция «RCEM 2022». 2022, 570-571.

[A8] Кудрявцева Е., **Морозова А.** и др. Самосборка дипептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин по данным атомно-силовой микроскопии. XXIX Российская конференция «RCEM 2022». 2022, 552-553.

[A9] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Главный фактор образования наноструктур в тонких органических пленках на основе дипептида глицил-глицин. IV семинар «Современные нанотехнологии» (IWMN-2022). 2022, 177.

[A10] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Самосборка олигопептидов ди- и триглицин в тонких пленках на поверхности гидрофильного и гидрофобного кремния. IV семинар «Современные нанотехнологии» (IWMN-2022). 2022, 172.

[A11] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Вода как главный фактор образования микро- и наноструктур в тонких органических пленках. XXVI Международный симпозиум «Нанопизика и наноэлектроника». 2022, 469-470.

[A12] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Влияние степени гидрофобности подложек на формирование кристаллических нано-структур на основе трипептида глицина. XXVI Международный симпозиум «Нанопизика и наноэлектроника». 2022, 316-317.

[A13] Зиганшина С., **Морозова А.** и др. Формирование наноразмерных структур на основе триглицина под действием органических соединений на различных кремниевых подложках. XXIV Международный симпозиум «Нанопизика и наноэлектроника». 2022, 380-381.

[A14] Зиганшина С., **Морозова А.** и др. Влияние подложки на самосборку глицил-глицина в тонких пленках под действием паров органических соединений. XXIV Международный симпозиум «Нанопизика и наноэлектроника». 2022, 364-365.

[A15] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Наноразмерные структуры на основе триглицина, сформированные из тонкой пленки на кремниевых подложках под действием органических соединений. Объединенная конференция КЭЛТ – 2021. 2021, 199-200.

[A16] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Наноразмерные структуры на основе диглицина по данным сканирующей зондовой микроскопии. XXV Международный симпозиум «Нанопизика и наноэлектроника». 2021, 316–317.

[A17] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Самоорганизация ди- и трипептида на основе глицина под действием паров органических соединений по данным атомно-силовой микроскопии. XXVIII Российская конференция «RCEM 2020». 2020, 87.

[A18] **Morozova A.**, Ziganshina S. et al. Effect of the hydrophilicity degree of silicon substrate on the morphology of the triglycine film. Scanning Probe Microscopy (SPM-2019). 2019, 301.

[A19] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Влияние количества аминокислотных остатков в олигопептидах на основе глицина на их самоорганизацию в пленках. XXIII Международный симпозиум «Нанопизика и нанопэлектроника». 2019, 373-374.

[A20] **Morozova A.**, Ziganshina S. et al. Self-organization of tripeptide L-glycyl-L-glycyl-L-glycine in films before and after interaction with vapors of organic substances according to AFM. Scanning Probe Microscopy (SPM-2017). 2017, 188-189.

[A21] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Исследование методами атомно-силовой микроскопии процессов самоорганизации в пленках дипептида при воздействии пароподобных органических соединений. XX Международная научная школа (КООС-2016). 2016, 168.

[A22] **Морозова А.**, Зиганшина С. и др. Морфология пленок дипептида глицил-глицин до и после взаимодействия с парами органических веществ. II Международная школа-конференция «Материалы и технологии XXI века». 2016, 280.