

Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского –  
обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный  
исследовательский центр  
«Казанский научный центр Российской академии наук»

*На правах рукописи*

**Морозова Анна Сергеевна**

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

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

**Диссертация  
на соискание учёной степени кандидата химических наук**

Научный руководитель:  
д.ф.-м.н., профессор  
Бухараев А.А.

Казань – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1. Олигопептиды.....	11
1.2. Получение нано- и микроразмерных структур: молекулярная самосборка и самоорганизация.....	15
1.2.1. Подходы «сверху-вниз» и «снизу-вверх».....	15
1.2.2. Молекулярная самосборка и самоорганизация .....	16
1.3. Методы формирования наноструктур на основе олигопептидов благодаря самоорганизации и самосборки .....	17
1.4. Факторы, влияющие на самоорганизацию и самосборку олигопептидов .....	21
1.4.1. Влияние типа, количества и порядка следования аминокислотных остатков, входящих в состав олигопептида .....	21
1.4.2. Влияние растворителя, из которого происходит кристаллизация наноматериала .....	24
1.4.3. Влияние концентрации раствора.....	25
1.4.4. Влияние влажности.....	26
1.4.5. Влияние температуры.....	27
1.4.6. Влияние подложки.....	28
1.4.7. Влияние паров органических соединений .....	31
1.5. Свойства и применение наноструктур на основе олигопептидов .....	33
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	37
2.1. Материалы.....	37
2.1.1. Методика получения пленок олигопептидов на основе глицина. ....	37
2.1.2. Методика получения пленок олигопептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин.....	38
2.1.3. Методика насыщения аморфных пленок олигопептидов парами органических соединений. ....	38
2.2. Методы исследования наноструктур на основе олигопептидов .....	39
2.2.1. Получение изображений с помощью атомно-силовой микроскопии. ....	39
2.2.2. Атомно-силовая спектроскопия (АСС). ....	40
2.2.3. Силовая микроскопия пьезоэлектрического отклика (СМПО) .....	41

2.2.4. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	45
2.2.5. Анализ динамического рассеяния света (ДРС).....	45
2.2.6. $\zeta$ -потенциал.....	45
2.2.7. Метод распылительной сушки .....	45
2.2.8. Порошковая рентгеновская дифрактометрия (ПРД).....	46
2.2.9. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) .....	46
2.2.10. Квантово-химические расчеты .....	46
ГЛАВА 3. САМООРГАНИЗАЦИЯ ОЛИГОПЕПТИДОВ. ....	47
3.1. Влияние подложки на формирование аморфных пленок олигопептидов .....	47
3.2. Влияние паров органических соединений на самосборку олигопептидов в тонкой пленке. ....	53
3.3. Главный фактор самосборки дипептида глицил-глицин. ....	72
3.3.1. Самосборка дипептида глицил-глицин инициируемая взаимодействием со смесью паров воды и органических соединений .....	73
3.3.2. Механизм влияния паров воды на самосборку глицил-глицина .....	83
3.4. Влияние порядка следования аминокислотных остатков в дипептидах L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин на формирование наноструктур. ....	90
3.4.1. Самоорганизация и самосборка L-лейцил-L-фенилаланина.....	90
3.4.2. Самоорганизация и самосборка L-фенилаланил-L-лейцина.....	94
3.5. Пьезоэлектрические свойства структур на основе дипептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин .....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	101
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ .....	103
БЛАГОДАРНОСТИ .....	104
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ.....	105
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ: .....	110

## ВВЕДЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена экспериментальному исследованию самосборки короткоцепных олигопептидов: глицил-глицина, глицил-глицил-глицина, L-лейцил-L-фенилаланина и L-фенилаланил-L-лейцина, – с образованием органических нано- и микрокристаллических структур методом атомно-силовой микроскопии. Выбор объектов исследования обусловлен возможностью их применения в биосовместимых и экологически чистых микро- и наноустройствах.

### **Актуальность и степень разработанности темы.**

В настоящее время значительный интерес исследователей привлекают короткоцепные олигопептиды, способные к самосборке и самоорганизации с образованием различных наноструктур и наноматериалов. Такие материалы биосовместимы, обладают биологической активностью, повышенной термостабильностью, рядом уникальных физических свойств и могут быть использованы при решении задач медицины, экологии, энергетики.

Основными способами получения организованных структур на основе олигопептидов являются кристаллизация из растворов с одним или двумя растворителями, термическая обработка порошков или пленок, а также обработка аморфных пленок олигопептидов парами различных соединений. При этом результат самосборки или самоорганизации зависит от множества факторов, в том числе от структурных особенностей самих олигопептидов, физико-химических свойств используемой среды, а также внешних параметров, например, внешнего магнитного поля, температуры, типа подложки и т.д. Следует отметить, что в литературе крайне редко учитывается присутствие воды в жидких растворителях или их парах, которая может оказать критическое влияние на самосборку.

Таким образом, можно отметить, что 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 наноматериалов на их основе, а также для точного контроля типа формирующихся структур.

Изучение и характеристика функциональных свойств отдельных наноразмерных объектов необходимы для поиска новых материалов и разработки стратегий их получения. На ряду со многими физическими методами атомно-силовая микроскопия (АСМ) занимает важное место в биологических, медицинских и фармакологических исследованиях, поскольку позволяет изучать структурные и механические свойства широкого круга биологических веществ, включая биомолекулы, биоматериалы, клетки и ткани. Этот вид микроскопии применяется для получения изображений образцов с высоким разрешением и детализацией их структурных особенностей. В связи с этим метод АСМ был использован в настоящей работе для изучения процессов самосборки олигопептидов и свойств структур на их основе. В качестве основных объектов исследования были выбраны ди- и трипептид на основе простейшей аминокислоты: глицин, – а также дипептиды L-лейцил-L-фенилаланин и L-фенилаланил-L-лейцин, содержащих одновременно остатки алифатической и ароматической аминокислот и отличающиеся последовательностью аминокислотных остатков.

### **Цель и задачи работы**

Цель настоящей 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 в работе сформулированы соответствующие **задачи** исследования:

- Исследование влияния природы подложек на формирование наноструктур на поверхности пленок ди- и трипептида на основе глицина под действием паров органических соединений и воды.
- Исследование влияния паров воды и органических соединений, отличающихся по физико-химическим свойствам, а также количества аминокислотных остатков в молекуле олигопептида, на самосборку ди- и трипептида на основе глицина в тонких пленках.

- Изучение механизма формирования кристаллических наноструктур на основе глицил-глицина.
- Исследование влияния порядка следования аминокислотных остатков в дипептидах, содержащих фенилаланин и лейцин, на тип формирующихся структур и их свойства.
- Изучение физических свойств, 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 (сляда и ВОПГ) 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 парообразных

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 с целью подбора оптимальных условий для формирования органических биосовместимых наноструктур на основе 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. Продемонстрированы 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  $\zeta$ -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:**

- Ключевая роль материала и степени гидрофобности подложки в процессе самосборки ди- и трипептида на основе глицина в аморфные пленки.
- 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»
- 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.
- Пьезоэлектрические свойства кристаллических структур дипептидов L-фенилаланил-L-лейцин 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 и списка использованных источников, включающего 110 наименований. Объем диссертации насчитывает 121 страницы 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 «Создание интеллектуальных систем и функциональных материалов для нано- и биотехнологий, элементной базы нанoeлектроники и оптоэлектроники, устройств преобразования и хранения энергии. Диагностика дисперсных систем, наночастиц и материалов, включая наноматериалы» (рег. № АААА-А18-118041760011-2), «Фундаментальные основы молекулярного конструирования, физико-химического анализа строения и функциональных свойств новых интеллектуальных систем и материалов для современных наукоемких технологий в области биомедицины, катализа, энергетики, нано- и оптоэлектроники» (рег. № 122011800132-52) 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, КФУ (2016), Международной молодежной научной школе «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия», г. Казань, КФУ (2016, 2017, 2019), Международной научной конференции «Сканирующая зондовая микроскопия», г. Екатеринбург, УрФУ (2017, 2018, 2019, 2022), Международной конференции молодых ученых International conference

Physica.SPb/2017, г. Санкт-Петербург, ФТИ им. А.Ф. Иоффе (2017), Международном симпозиуме «Нанопфизика и наноэлектроника», г. Нижний Новгород (2019, 2020, 2021, 2022, 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 были опубликованы в 22 печатных работах, из них 4 статьи в рецензируемых российских и зарубежных научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов кандидатских диссертаций, а также в 18 тезисах докладов в материалах конференций и симпозиумов различного уровня.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

В данной главе собраны и систематизированы современные литературные данные об олигопептидах, способах получения наноструктур на их основе, а также факторах, влияющих на их самосборку и самоорганизацию.

### 1.1. Олигопептиды

Пептиды (от греч. *peptós* – питательный) – природные или синтетические вещества, молекулы которых построены из остатков  $\alpha$ -аминокислот, соединенных в цепь амидными связями [1]. В зависимости от количества аминокислотных остатков в пептидах различают олигопептиды и полипептиды.

Олигопептиды – природные или синтетические вещества, состоящие из небольшого числа аминокислотных остатков, соединенных пептидной связью. Эта связь образуется при взаимодействии карбоксильной группы одной аминокислоты с аминогруппой другой аминокислоты. Согласно правилам ИЮПАК [2], количество аминокислотных остатков в олигопептидах четко не определено. Считается, что наиболее характерным является содержание от 3 до 10 аминокислотных остатков в молекулах олигопептидов [2]. Вместе с тем следует отметить, что в литературе термин «олигопептид» широко используется для обозначения дипептидов [3, 4]. Короткоцепные пептиды (олигопептиды), в настоящее время, активно исследуются в связи с возможностью их применения в различных областях, таких как оптика и энергетика, медицина, материаловедение и др. [5].

Схематическое изображение структуры дипептида приведено на Рисунке 1. Как и аминокислоты, дипептиды находятся в газовой фазе в молекулярной форме, Рисунок 1а, а в водном растворе и твердом состоянии преобладающей является цвиттер-ионная форма, Рисунок 1б, [6-8]. В этой форме аммонийная ( $-\text{NH}_3^+$ ) группа выступает в качестве сильного протонодонора, а карбоксилатная ( $-\text{COO}^-$ ) группа является сильным протоноакцептором.

Дипептиды являются промежуточными соединениями между полипептидами и аминокислотами [9]. Если в молекуле олигопептида содержится

три аминокислотных остатка, то такую молекулу называют трипептид. Порядок связывания аминокислот в молекуле называется первичной структурой олигопептида.

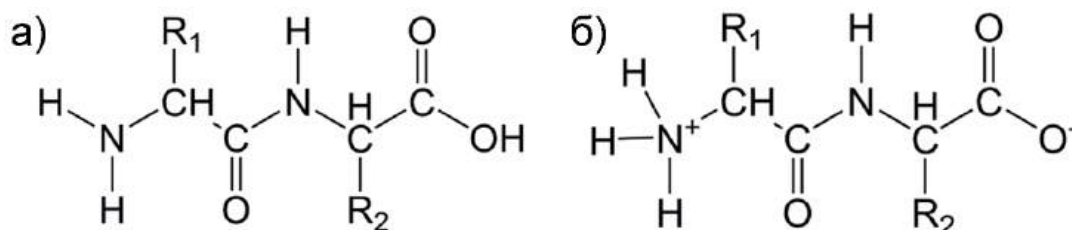


Рисунок 1 – Химические формулы молекулярной (а) и цвиттер-ионной (б) структур дипептида. R – заместители

Первичная структура (тип, количество и порядок следования аминокислотных остатков) олигопептида в значительной степени определяет форму и вид наноструктур, формирующихся при его самоорганизации на поверхности подложек [10]. Например, дифенилаланин при самосборке из раствора формирует нанотрубки, в то время как дифенилглицин, отличающийся от дифенилаланина на две  $-\text{CH}_2-$  группы, образует сферы [11, 12]. Авторами [13] исследовано влияние последовательности аминокислотных остатков в тетрапептидах  $\text{Woc-Gly-Phe-Aib-Leu-OMe}$  и  $\text{Woc-Gly-Leu-Aib-Phe-OMe}$ . Было обнаружено, что в первом случае формируются нескрученные нити, а для  $\text{Woc-Gly-Leu-Aib-Phe-OMe}$  зафиксированы лентовидные структуры.

Так же, как и для белков, для олигопептидов характерна вторичная структура. Основными являются [14]:  $\alpha$ -спирали [15] и  $\beta$ -слои [16].

#### $\alpha$ -Спираль

На протяжении десятилетий было известно, что физические и биологические свойства могут способствовать формированию спиральных структур. Однако с появлением дизайна материалов только недавно были обнаружены ключевые молекулы для включения этих спиральных структур в биоматериалы [14].

$\alpha$ -Спиральная структура формируется за счет образования водородной связи между амидами. Их последующая упаковка в свернутые рулоны и

дальнейшая сборка в упорядоченные структуры обусловлены взаимодействием боковых цепей аминокислот [17]. На каждый виток приходится 3.6 аминокислотного остатка, шаг винта составляет 0.54 нм. Спирали в среднем содержат около 12 аминокислотных остатков. Схематическое изображение  $\alpha$ -спирали олигопептида представлено на Рисунке 2.

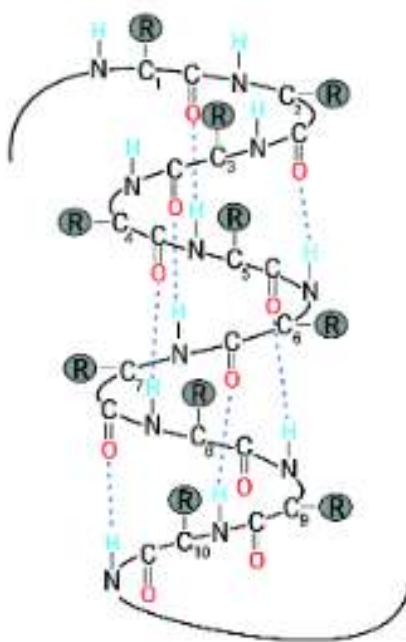


Рисунок 2 – Схематическое изображение  $\alpha$ -спирали олигопептида [18]

Взаимодействие с другими спиральями возможно с помощью боковых цепей аминокислот, так как они выступают из спирали наружу. Тем не менее, получение таких наноструктур сложная задача на практике, отчасти потому, что для большей длины (20-30 аминокислот) требуется установление стабильного  $\alpha$ -спирального взаимодействия.

Спиралевидные структуры формируются путем сборки  $\alpha$ -спиралей в более упорядоченные структуры. Такие объекты формируются благодаря повторяющимся гидрофобным и заряженным аминокислотным остаткам [14]. Одной из таких структур, нашедших свое практическое применение, является самоорганизованный гидрогель [19].

## $\beta$ -Слои

$\beta$ -Слои являются наиболее распространенными природными строительными блоками, которые могут быть использованы в самоорганизации олигопептидов [14, 20] и белковых структур [20].  $\beta$ -Слои состоят из последовательностей, с чередующимися гидрофобными и гидрофильными аминокислотными остатками, тем самым обеспечивая пептидный остов амфифильными свойствами. Например, ленты из  $\beta$ -слоев за счет притяжения зарядов между волокнами способны объединяться и формировать гидрогели [14, 20]. Схематическое изображение  $\beta$ -слоя олигопептида показано на Рисунке 3.

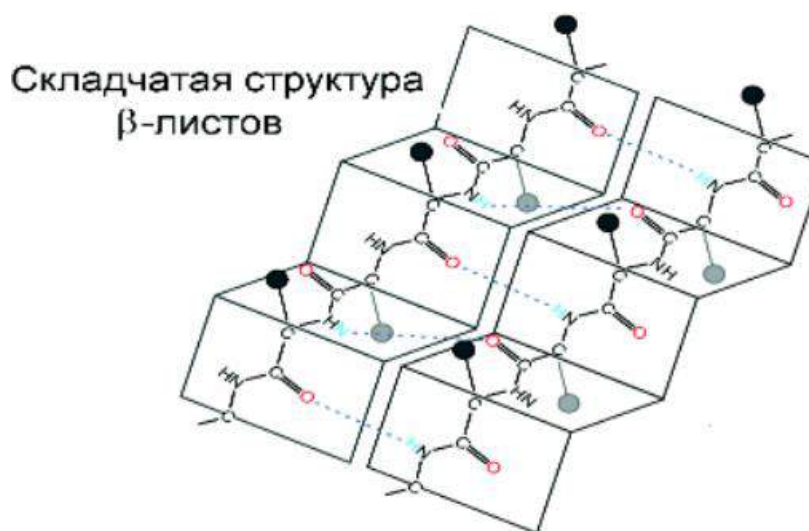


Рисунок 3 – Схематическое изображение  $\beta$ -слоя олигопептида [18]

Короткоцепные олигопептиды являются привлекательными строительными блоками из-за их простого синтеза, богатого химического разнообразия и присущей им биосовместимости [21]. Самосборка и самоорганизация пептидов может дать ряд четко определенных наноструктур, которые представляют собой перспективные наноматериалы для многих биомедицинских применений, таких как доставка лекарств. Некоторые из преимуществ самособирающихся пептидных наноструктур по сравнению с другими платформами доставки лекарств включают их химическое разнообразие, биосовместимость, как для гидрофобных, так и для гидрофильных препаратов [14].

## 1.2. Получение нано- и микроразмерных структур: молекулярная самосборка и самоорганизация.

Существует два подхода получения наноразмерных объектов: «top-down» (сверху-вниз) и «bottom-up» (снизу-вверх). Схематическое представление «сверху-вниз» и «снизу-вверх» процессов синтеза наноматериалов представлено на Рисунке 4.

### 1.2.1. Подходы «сверху-вниз» и «снизу-вверх».

Подход «сверху-вниз» предполагает разрушение объемного материала до нано-и микроразмерных структур или частиц. Минимальный размер частиц, получаемых при использовании этого подхода, составляет микроны. Примером использования такого подхода является мокрый помол на шаровой мельнице [22]. Измельчение объемных материалов представляет наибольший интерес в обработке керамики и минералов, порошковой металлургии. В результате размола происходит уменьшение размеров частиц, перемешивание и изменение формы частиц.

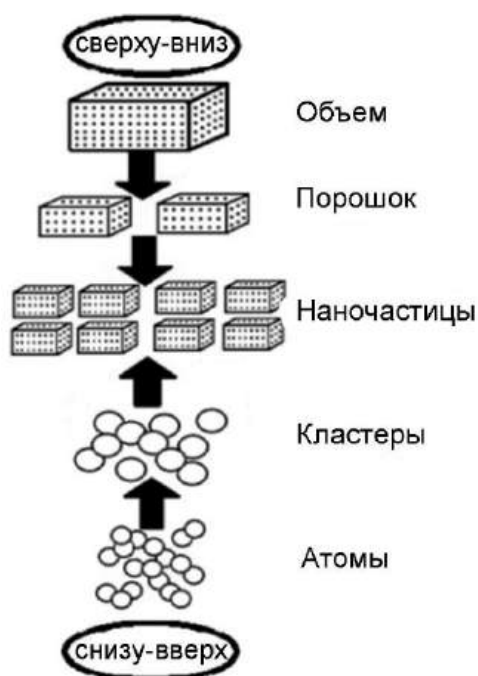


Рисунок 4 – Схематическое представление «сверху-вниз» и «снизу-вверх» процессов синтеза наноматериалов

Трудность подхода «сверху-вниз» заключается в разбиении всех частиц до требуемого размера. Главным преимуществом этого подхода являются высокие темпы производства нанопорошков.

Например, с использованием данного подхода были изготовлены ZnO нанопровода [23]. Для получения таких нанопроводов брали образец кремния со слоем, термически выращенного на подложке SiO<sub>2</sub>. Далее образец подвергался анизотропному травлению материала на плоской подложке. Следовательно, этот подход может обеспечить образование нанопроводов, с меньшей шероховатостью, в четко определенных местах на пластине и позволяет создать нанопроволоки различной длины, на том же самом чипе [23].

Подход «снизу-вверх» основан на формировании материала или наноструктур от самых мелких структурных единиц: атом за атомом, молекула за молекулой, кластер за кластером. В настоящее время большой раздел этого подхода называется «Супрамолекулярной химией» [24]. В методе «снизу-вверх» простые строительные блоки взаимодействуют друг с другом для формирования больших и более сложных супрамолекулярных ансамблей или наноструктур [12, 25]. Создание материалов с использованием подхода «снизу-вверх» требуют глубокого понимания молекулярных структур, их ансамблей и динамического поведения. Такой подход, с использованием молекулярного самосборки в качестве инструмента изготовления, станет неотъемлемой частью производства материалов, особенно наноматериалов, в ближайшие годы [25].

К подходу «снизу-вверх» относятся и такие понятия как молекулярная самосборка и самоорганизация.

### *1.2.2. Молекулярная самосборка и самоорганизация*

Молекулярную самосборку и самоорганизацию в общем смысле можно определить, как самопроизвольные и обратимые процессы упорядочивания молекулярных единиц в супрамолекулярные структуры за счет внутри- и/или межмолекулярных нековалентных взаимодействий [24-27]. Эти понятия



используются при описании процессов формирования наноструктур на основе олигопептидов, и, на первый взгляд, различия между ними неочевидны. Тем не менее, самосборка и самоорганизации с точки зрения термодинамики представляют собой разные процессы. При молекулярной самосборке происходит пространственное упорядочивание молекул за счет специфических и локальных взаимодействий. Самосборка происходит самопроизвольно в закрытой системе и ее результатом всегда будет уменьшение свободной энергии системы [27]. Таким образом, структуры, образующиеся в результате самосборки, соответствуют термодинамическому равновесию.

Самоорганизация, напротив, осуществляется вдали от термодинамического равновесия. Она возможна только в открытых системах с внешним источником энергии [27]. Самоорганизация с образованием иерархических структур как на нано-, так и на микроуровне происходит для достижения минимального энергетического состояния.

Некоторые авторы не разделяют данные понятия и употребляют термин «самосборка» как в условиях термодинамического, так и кинетического контроля процесса [26-28]. Тем не менее, в настоящей работе эти термины будут использоваться согласно их термодинамическому смыслу. Например, для описания процессов формирования упорядоченных наноструктур на основе олигопептидов в условиях быстрого и неравновесного испарения растворителя далее будет использоваться понятие «молекулярная самоорганизация» [27, 29]. Процессы формирования структур вблизи термодинамического равновесия будут описаны в рамках понятия «молекулярной самосборки».

### **1.3. Методы формирования наноструктур на основе олигопептидов благодаря самоорганизации и самосборки**

При создании наноструктур на основе олигопептидов используют различные методы [30-32]. Наиболее популярными являются получение наноструктур из растворов олигопептидов в различных растворителях [32-33] и формирование наноструктур в тонких пленках [30, 31].

Методы получения наноструктур, например, на основе дифенилаланина хорошо отработаны и позволяют получать различные структуры на его основе [34]. Например, авторы [34] показывали образование упорядоченных наноструктур на основе короткоцепных олигопептидов  $L$ -фенилаланил- $L$ -фенилаланин (PhePhe) и  $L$ -фенилаланил- $L$ -фенилаланил- $L$ -фенилаланин (PhePhePhe). Оба олигопептида растворяли во фторированном спирте, а затем разбавляли водой. PhePhe самособирался в упорядоченные дискретные пептидные нанотрубки (Рисунок 5А).

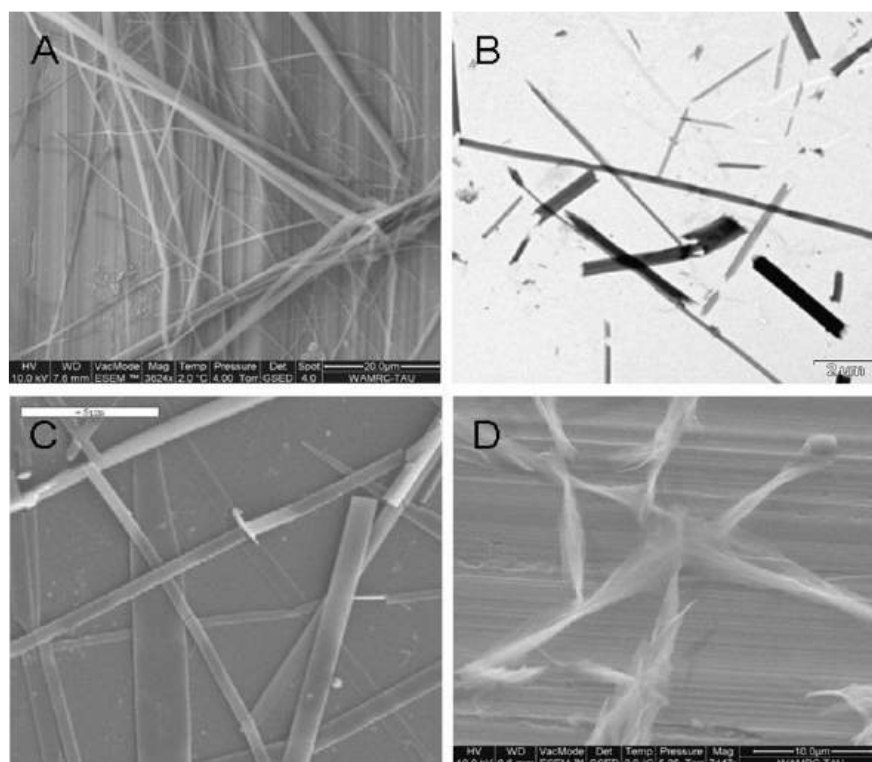


Рисунок 5 – Самосборка олигопептидов фенилаланина в упорядоченные наноструктуры. (А) ESEM удлиненных дискретных нанотрубок PhePhe. (В) ПЭМ пластинчатых сборок PhePhePhe как отдельных объектов. (С) СЭМ демонстрирует характерные плоские наноструктуры сборок PhePhePhe. (D) ESEM-изображение сборок PhePhePhe [34]

PhePhePhe в сходных условиях самособирался с образованием пластинчатых наноструктур. Анализ с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показал, что PhePhePhe формирует хорошо упорядоченные удлиненные структуры (Рисунок 5В). Формирование ансамблей было очень эффективным,

аморфных агрегатов практически не наблюдалось. Для дальнейшего изучения структур PhePhePhe использовали и метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). СЭМ дополнительно продемонстрировала, что структуры на основе PhePhePhe, подобно нанотрубкам PhePhe, представляют собой относительно однородные образования с длиной порядка микрометра (Рисунок 5С). Сканирующая электронная микроскопия окружающей среды (ESEM) продемонстрировала морфологию сборки в водном растворе (Рисунок 5D).

К достоинствам метода получения наноструктур из растворов олигопептидов в различных растворителях относятся возможность совместной самоорганизации нескольких олигопептидов из раствора. Например, авторами [32] описано получение сложных структур из дифенилаланина и его *трет*-бутилдикарбонат (ВОС) производного. По отдельности каждый из этих олигопептидов образует специфические архитектуры: дифенилаланин – трубчатые структуры, а его ВОС-производное – сферы. При совместной самоорганизации эти олигопептиды формируют ожерелья, состоящие из сфер, соединенных удлинёнными элементами [32]. Недостатками метода получения наноструктур из растворов можно считать большой расход растворителей, необходимость приготовления растворов с точной концентрацией веществ [33, 35] и чувствительности системы к внешним факторам, таким как температура раствора [36] и наличие примесей [37].

Для получения наноструктур в тонких пленках используют различные способы, такие как осаждение из паровой фазы на различные подложки [30], технология Ленгмюр-Блоджетт [31], обработка тонких аморфных пленок парами органических соединений или воды [38, 39].

Методы осаждения из паровой фазы использовались для производства различных типов материалов, включая волокна, нанотрубки, порошки, тонкие пленки, многослойные покрытия и отложения с градиентным составом в течение многих лет [40]. Осаждение из паровой фазы, как правило, происходит при повышенных температурах, при которых возможно протекание химической реакции циклизации [41], поэтому наноструктуры получаются из продуктов реакций, а не из исходных дипептидов.

Пленки Ленгмюр-Блоджетт (ЛБ) широко используются в сенсорах, биосенсорах и исследованиях моделей клеточных мембран, поскольку их молекулярную организацию можно строго контролировать, что приводит к удовлетворительным экспериментальным результатам [42]. Однако, так как методика ЛБ заключается в процессе переноса монослоя материала с границы воздух-вода на твердую подложку [43], то при переносе монослоя его структура часто изменяется. Поэтому, для построения высококачественных пленок необходим тщательный контроль экспериментальных параметров, таких как стабильность и однородность монослоя, свойства субфазы (состав, pH, наличие электролитов и температура), природа подложки, скорость погружения/всплытия подложки, поверхностное давление в процессе осаждения и количество переносимых монослоев [43].

В последнем случае, тип образующихся наноструктур можно изменять, варьируя растворитель и/или парообразный компонент, а также время насыщения пленки парами [44]. Одним из ограничений формирования аморфных тонких пленок являются требования, предъявляемые к подложкам: атомарно-гладкая поверхность без дефектов, а также отсутствие сильного ван-дер-ваальсовского взаимодействия с молекулами олигопептидов. В противном случае происходит формирование структурированных органических пленок [45].

#### 1.4. Факторы, влияющие на самоорганизацию и самосборку олигопептидов.

В настоящее время установлено, что вид наноструктур, образующихся при самоорганизации олигопептидов, зависит от ряда факторов, таких как тип, количество и порядок следования аминокислот, входящих в состав пептида, растворитель, из которого происходит кристаллизации наноматериала, pH среды, концентрация пептида в растворе и даже магнитное поле [46].

##### 1.4.1. Влияние типа, количества и порядка следования аминокислотных остатков, входящих в состав олигопептида

Первичная структура (тип, количеств и порядок следования аминокислотных остатков) олигопептида в значительной степени определяет форму и вид наноструктур, формирующихся при его самоорганизации на поверхности.

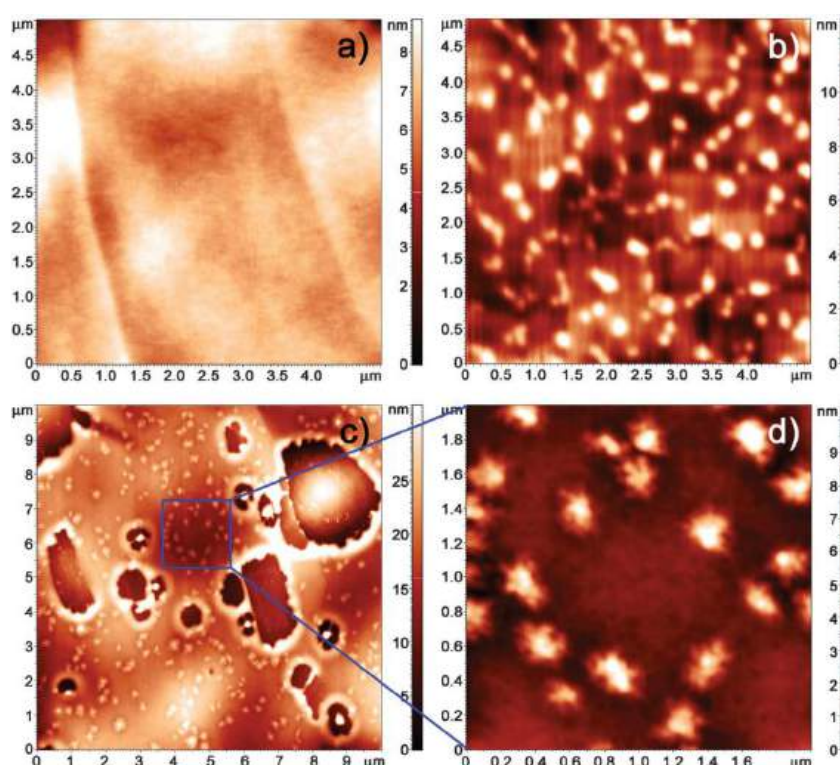


Рисунок 6 – АСМ изображения поверхности (а) исходной AlaVal -пленки, нанесенной на поверхность ВОПГ из раствора метанола; пленка был насыщена парами (b) пиридина в течение 2 ч, (c) и (d) дихлорметана в течение 75 мин,  $T = 298 \text{ K}$ . До АСМ эксперимента все пленки высушивались горячим воздухом ( $45^\circ\text{C}$ ) в течение 2 мин [10]

Авторами [10] было исследовано влияние последовательности аминокислот в  $L$ -аланил- $L$ -валин (AlaVal) и  $L$ -валил- $L$ -аланин (ValAla) на их сорбционные свойства по отношению к органическим соединениям и воде. Изменения в морфологии тонких пленок AlaVal и ValAla после насыщения парами органических соединений и воды наблюдались непосредственно с помощью атомно-силовой микроскопии, Рисунок 6.

Установлено, что форма и размер нано- и микрообъектов, сформировавшихся на поверхности пленок, сильно зависят от физико-химических свойств органического соединения и структуры дипептида.

В работе [47] были изучены олигопептиды, содержащие разные последовательности остатков: A5N5 (5 аланинов и 5 аспарагинов), D5N5 (5 аспарагиновых кислот и 5 аспарагинов), H5D5 (5 гистидинов и 5 аспарагиновых кислот), а также еще 3 образца с другим порядком следования аминокислотных остатков в молекуле: N5A5, N5D5, H5D5.

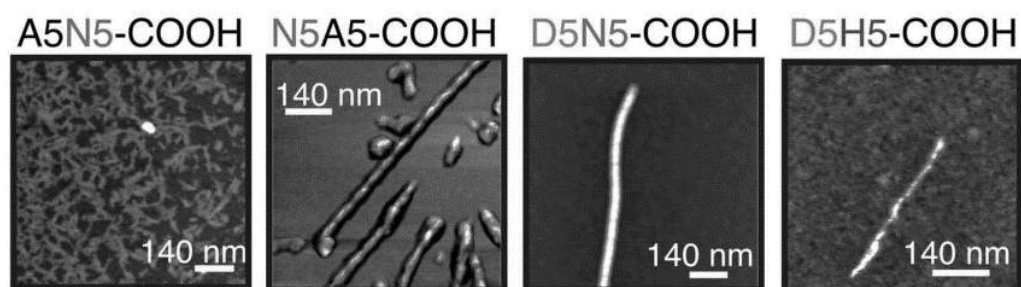


Рисунок 7 – АСМ изображения пептидов, инкубированных в течение 2 дней при pH 2.5 [47]

Первая последовательность, A5N5, образовывала пептидные агрегаты небольших размеров, Рисунок 7, высотой  $0.8 \pm 0.1$  нм, в то время как N5A5, давала скрученные амилоидоподобные фибриллы высотой  $4.0 \pm 0.2$  нм. При замене аланина аспарагиновой кислотой (D5N5) наблюдались нескрученные фибриллы высотой  $3.0 \pm 0.2$  нм. Его замененный аналог (N5D5) имел структуру пористой пленки. При замене аспаргина гистидином, D5H5, в АСМ анализе видны только частицы и

небольшие пептидные фрагменты высотой  $1.4 \pm 0.1$  нм. Для последней последовательности, H5D5, наблюдался однородный массив пептидных пятен.

Типы аминокислот, входящих в состав олигопептида оказывают значительно влияние на образование наноструктур, Рисунок 8 [11, 12]. Например, различие в структуре молекул дипептидов всего на две  $-\text{CH}_2-$  группы приводит к значительным различиям в образующихся наноструктурах. При наличии двух  $-\text{CH}_2-$  групп происходит самоорганизация дипептида в нанотрубки, при отсутствии  $-\text{CH}_2-$  в сферы [11, 12].

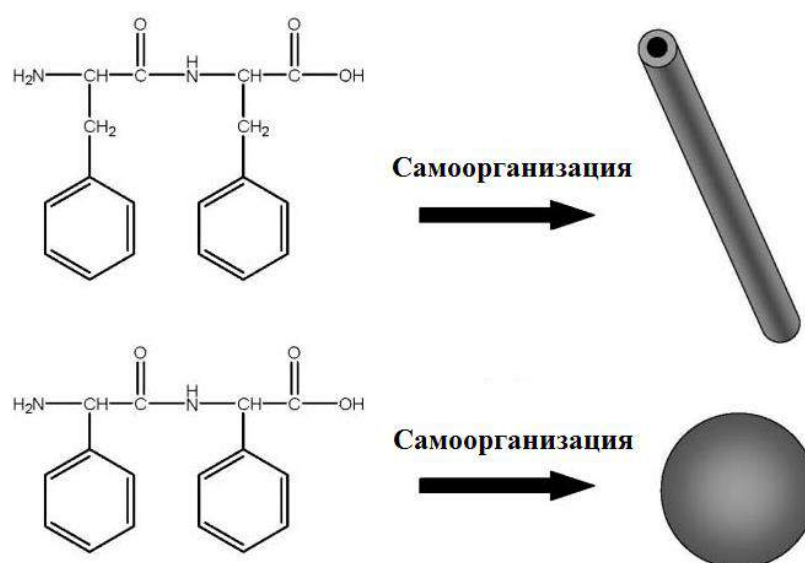


Рисунок 8 – Формирование упорядоченных наноструктур простым ароматическим дипептидом [12]

Таким образом, можно «настраивать» морфологию самособирающихся наноструктур, изменяя количество, тип и последовательность аминокислотных остатков.

Следует отметить, что вопрос о влиянии типа аминокислотных остатков, а также последовательности их соединения в молекуле на способность олигопептида формировать тот или иной тип наноструктуры к настоящему времени остается практически не изученным.

#### 1.4.2. Влияние растворителя, из которого происходит кристаллизация наноматериала

Природа растворителя или его концентрация в смеси оказывает значительное влияние на форму и вид наноструктур при кристаллизации олигопептидов. Например, авторами [48] был представлен структурный переход самоорганизующегося органогеля из дипептида дифенилаланин с образованием микрокристаллов в виде цветков при кристаллизации из толуола при введении этанола в качестве соразтворителя, Рисунок 9.

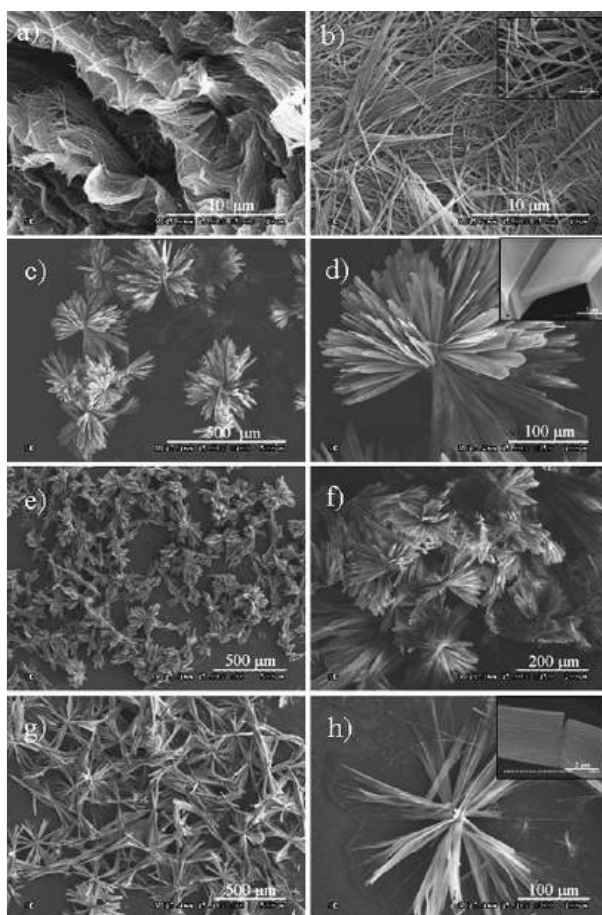


Рисунок 9 – СЭМ-изображения образцов, сформированных при различном содержании этанола: а) 0%; б) 10%; в, д) 25%; е) 40%; ф) 70%; г, з) 100% [48]

Исследования показали, что соразтворитель этанол, имеющий более высокую полярность, чем толуол, может быть вовлечен в образование водородных связей в процессе молекулярной самосборки дипептида в смешанных



растворителях, таким образом, это приводит к переходу органогелей в микрокристаллы.

В работе [49] было продемонстрировано влияние растворителя на морфологию пленки трипептида аланил-аланил-глицин (AlaAlaGlu). Были получены АСМ изображения пленок трипептида, нанесенных из различных растворов ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CCl}_4$  и  $\text{CHCl}_3$ ), Рисунок 10.

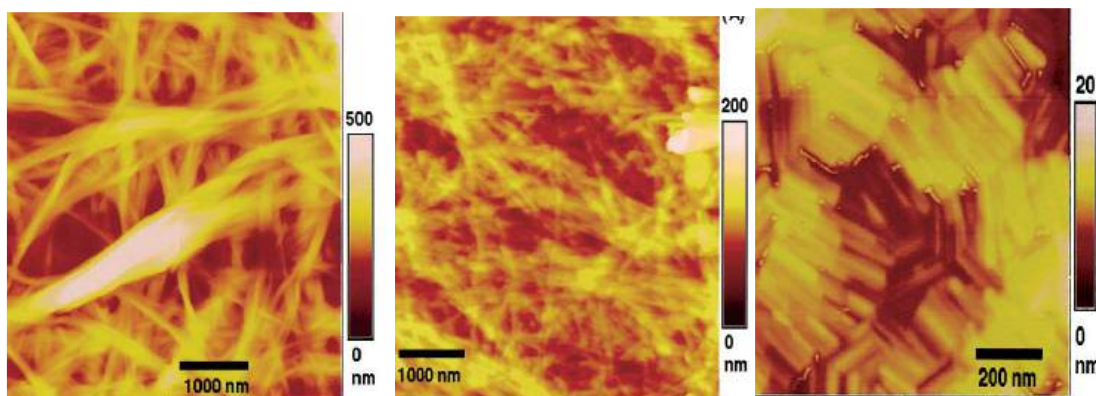


Рисунок 10 – АСМ изображения наноструктур трипептида, полученных из растворов: слева направо  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CHCl}_3$  [49]

Установлено, что из раствора в  $\text{CCl}_4$  формируются волокнистые пучки, из водного раствора – иглоподобные структуры, из хлороформа – регулярные гладкие структуры.

#### 1.4.3. Влияние концентрации раствора

Концентрация раствора олигопептида является ключевым фактором при формировании наноструктур из растворов на поверхности подложек [50]. Авторами [51] с помощью АСМ проводились исследования самосборки олигопептида GAV-9 ( $\text{NH}_2\text{-VGGAVVAGV-CONH}_2$ ) из его растворов в этаноле, Рисунок 11, и ацетоне с разной концентрацией. В качестве подложки использовалась слюда. Результаты показали, что органические растворители могут влиять на самоорганизацию олигопептида GAV-9 на поверхности слюды. Установлено, что при малой концентрации олигопептид самоорганизуется с

образованием стержней, Рисунок 11А, при увеличении концентрации до 7 мкМ на поверхности формируется небольшое количество фибрилл, Рисунок 11 В.

Дальнейшее увеличение концентрации приводит к формированию плотного слоя фибрилл с симметрией, соответствующей эпитаксии подложки, Рисунок 11 С. Если концентрация олигопептида была слишком высока (280 мкМ), фибриллы, формируемые на подложке, не имеют выделенного направления, Рисунок 11D [51].

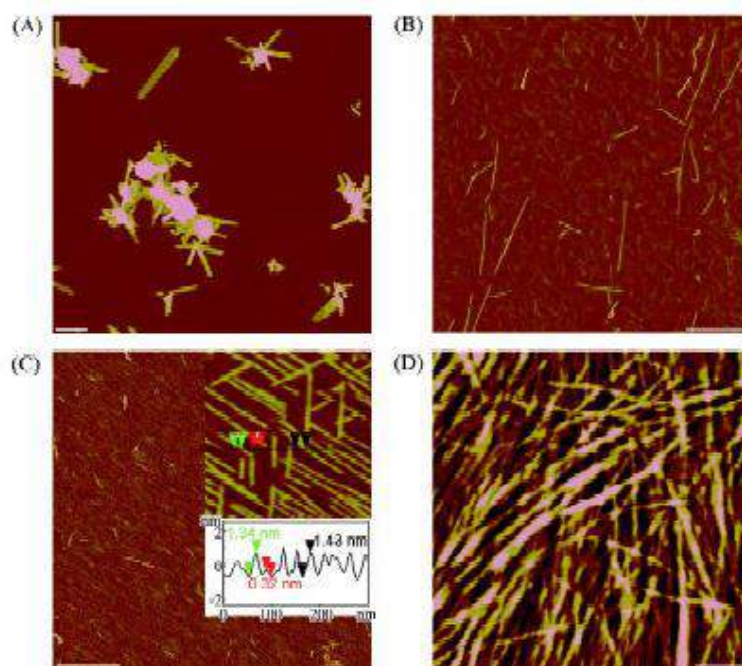


Рисунок 11 – АСМ изображения образцов в режиме топографии, приготовленных из олигопептида GAV-9 при различных его концентрациях в этаноле (А) 1.4 мкМ, (В) 7 мкМ, (С) 28 мкМ, и (D) 280 мкМ [51]

#### 1.4.4. Влияние влажности

Вода способна адсорбироваться на поверхности подложек и может связываться с олигопептидами, поэтому следует учитывать возможное влияние паров воды, содержащихся в воздухе, на морфологию пленок.

Авторами [52] для выяснения влияния влажности воздуха на морфологию пленки дипептида была получена пленка L-лейцил-L-лейцин (LeuLeu), нанесенная на ВОПГ при влажности воздуха 90%, Рисунок 12. Было обнаружено, что на ее поверхности присутствуют нанобразования, по форме похожие на элементы,

наблюдаемые на поверхности пленки, полученной в более сухом воздухе. При этом образовавшаяся пленка оказалась более гладкой. Обнаруженное влияние влажности воздуха на морфологию пленки LeuLeu может быть связано с тем, что толщина адсорбированного слоя воды на поверхности ВОПГ увеличивается в несколько раз при увеличении влажности от 45% до 90%. В результате этого площадь растекания капли раствора дипептида увеличивается, и толщина пленки уменьшается [52].

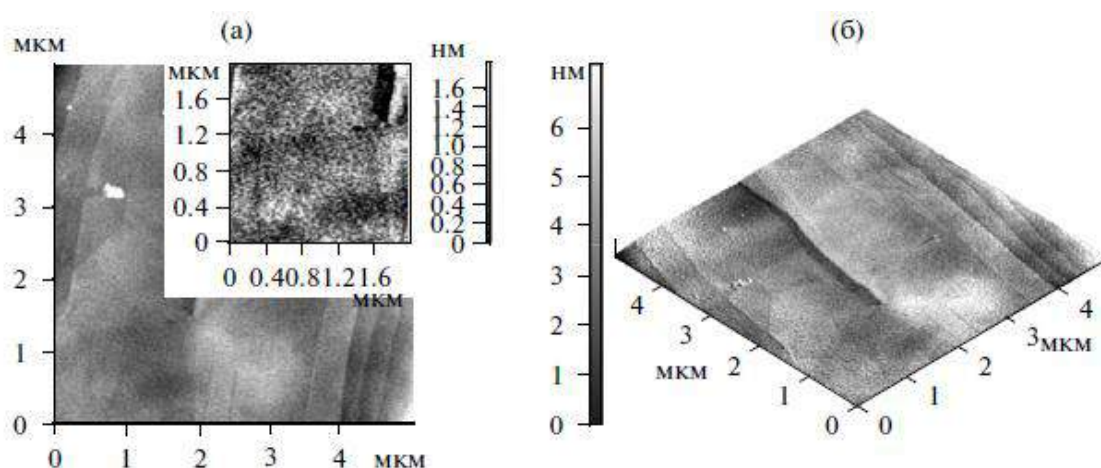


Рисунок 12 – АСМ изображения поверхности пленки дипептида LeuLeu, нанесенной на ВОПГ из раствора в метаноле. Температура 25°C, влажность воздуха 90%. После нанесения из раствора пленка осушалась в токе теплого воздуха 45°C в течение 3 минут. На вставке приведено АСМ изображение поверхности пленки размером  $2 \times 2 \text{ мкм}^2$  [52]

#### 1.4.5. Влияние температуры

Изменение температуры оказывает влияние на форму самособирающихся наноструктур на основе олигопептидов. В работе [53] была исследована самосборка тетрапептида RWDW (R = аргинин, W = триптофан, D = аспарагиновая кислота) при трех температурах 15°C, 25°C и 35°C, Рисунок 13.

Установлено, что при 15°C 44% поверхности слюды покрыто довольно густой сетью перепутанных волокон.

При 25°C на подложке присутствует слой фибрилл (покрытие 31%) поверх второго слоя фибрилл (общее покрытие 98%). При этой температуре образовались более короткие и толстые агрегаты. При 35°C образуются короткие почти круглые агрегаты, покрывающие лишь 13% поверхности слюды.

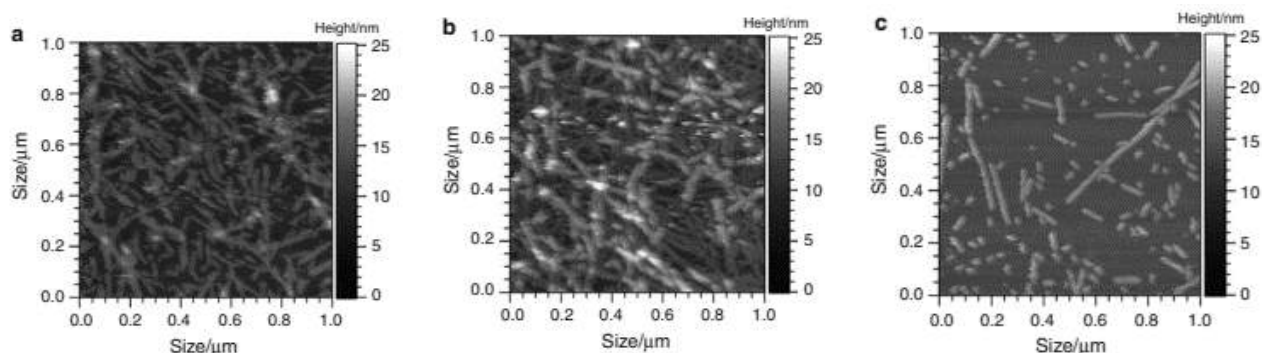


Рисунок 13 – АСМ изображение раствора RWDW, нанесенной на слюду при температурах: а) 15°C, б) 25°C и в) 35°C [53]

#### 1.4.6. Влияние подложки

Традиционно при исследовании объектов методами АСМ используются гладкие подложки, поверхность которых может быть легко обновлена или зачищена. К таким подложкам относятся слюда, высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ) и монокристаллический кремний.

ВОПГ и слюда – два материала, обладающие разными поверхностными свойствами: пирографит гидрофобен, в то время как слюда гидрофильна и отрицательно-заряжена. К тому же оба материала атомарно-гладкие и используются для исследования методом АСМ многих объектов, включая белки [54]. Слюды образуют группу минералов, характеризующихся совершенной спайностью – способностью расщепляться на тонкие пластинки с ровной поверхностью. Площадь таких ровных поверхностей обычно составляет от нескольких десятков до сотен квадратных микрометров.

Графит - распространенный в природе минерал. Встречается обычно в виде отдельных чешуек, пластинок и скоплений, разных по величине и содержанию графита. Пирографит — это графит, полученный осаждением газообразных

продуктов пиролиза углеводородов (в интервале 750-2400°C). Характеризуется высокой термической стойкостью и отсутствием открытой пористости. Поверхность пирографита обладает атомарно-ровными участками. Его кристаллическая решетка состоит из параллельных слоев, образованных правильными шестиугольниками из атомов углерода. Углеродные атомы каждого слоя расположены против центров шестиугольников, находящихся в соседних слоях (нижнем и верхнем). Положение слоев повторяется через один, а каждый слой сдвинут относительно другого в горизонтальном направлении [55, 56]. Это позволяет очищать поверхность путем скалывания с хорошей воспроизводимостью. Химически инертный пирографит не взаимодействует с наносимым образцом.

Авторами [41] исследована морфология тонких пленок глицил-глицина (GlyGly) и глицил-глицил-глицина (GlyGlyGly) на различных подложках, Рисунок 14.

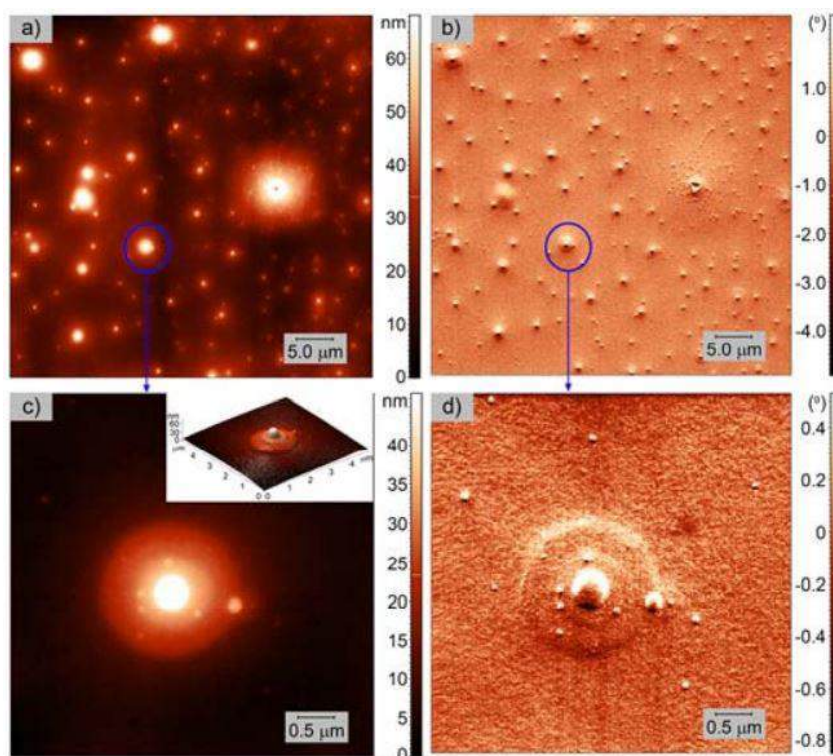


Рисунок 14 – АСМ изображения поверхности пленки GlyGly, нанесенной на слюду из метанольного раствора: в режиме топографии (а, с) и в режиме фазового контраста (b, d). На вставке показано трехмерное изображение объекта с Рисунок



Установлено, что дипептид образует пленку, покрытую сферическими объектами на гидрофильной поверхности слюды, Рисунок 14, и гладкую пленку на гидрофобной поверхности пирографита.

В случае трипептида гладкая пленка образуется на поверхности слюды, но на гидрофобной поверхности ВОПГ пленка покрыта кристаллическими объектами [41].

Авторами [57] изучалось взаимодействие пиллар[5]арена с плазмидной ДНК с помощью атомно-силовой микроскопии. Образцы наносились на поверхность свежего скола слюды. По данным АСМ изображений пиллар[5]арен- $\Gamma^-$  и пиллар[5]арен- $\text{Cl}^-$  упаковывают плазмидную ДНК в агрегаты диаметром около 100 нм с различной морфологией, Рисунок 15.

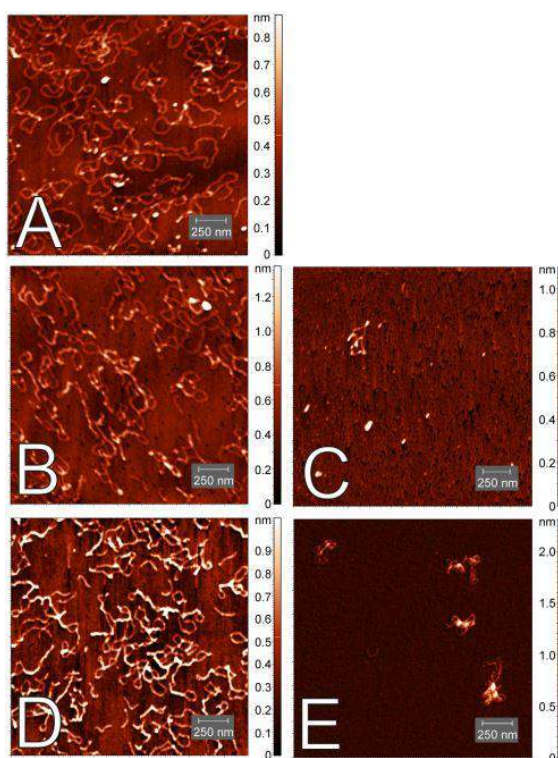


Рисунок 15 – АСМ изображение рEGFP-N1 плазмиды в свободном состоянии (А), смеси плазмиды-пиллар[5]арен- $\Gamma^-$  ( $z_+/z_-=0.1$ ) (В), плазмиды-пиллар[5]арен- $\Gamma^-$  ( $z_+/z_-=1$ ) (С), плазмиды-пиллар[5]арен- $\text{Cl}^-$  ( $z_+/z_-=0.1$ ) (D), плазмиды-пиллар[5]арен- $\text{Cl}^-$  ( $z_+/z_-=1$ ) (Е). Концентрация ДНК во всех случаях составляла 1 нМ [57]

#### 1.4.7. Влияние паров органических соединений

Обработка парами органических соединений изначально аморфных пленок является одним из широко используемых способов для формирования различных наноструктур из олигопептидов [38].

Так, авторы [38] использовали пары анилина, для выращивания нанотрубок из аморфных пленок олигопептида дифенилаланина на кремниевых подложках. Тонкую пленку аморфного олигопептида получали путем высушивания капли раствора гексафторизопропанола (ГФИП), содержащего дифенилаланин, на подложке Si, Рисунок 16. Используя аморфную пептидную пленку в качестве отправной точки, успешно вырастили вертикально хорошо ориентированные пептидные нанопроволоки путем высокотемпературного старения (свыше 100°C) в парах анилина.

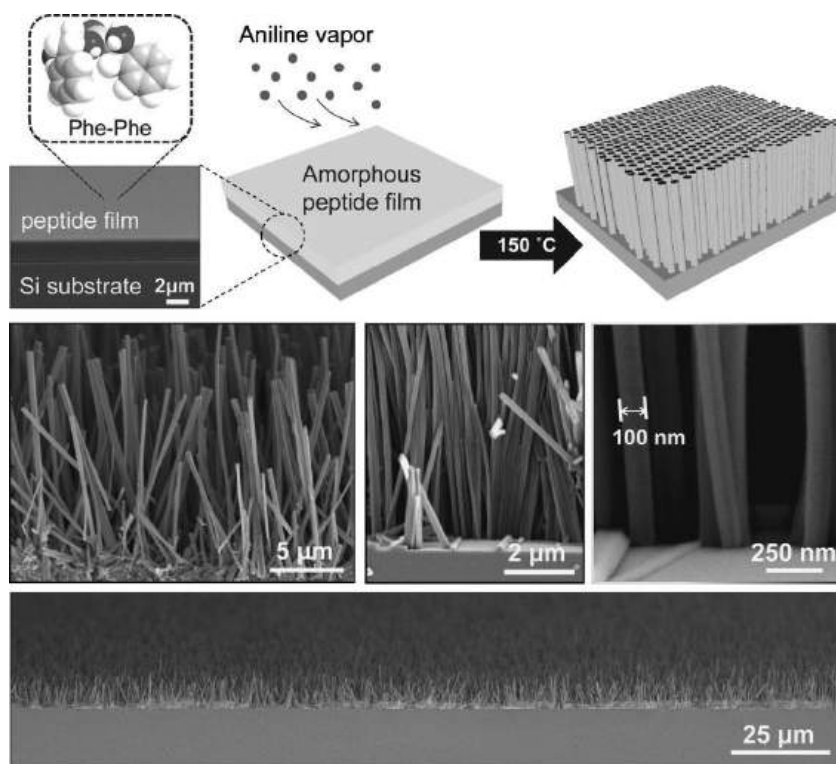


Рисунок 16 – Экспериментальная схема и электронные микрофотографии поперечного сечения, показывающие рост вертикально ориентированных нанопроволок из тонкой пленки аморфного пептида путем высокотемпературного старения в парах анилина [38]

С помощью АСМ авторами [10] исследовано влияние паров органических соединений на морфологию поверхности тонкой пленки трипептида  $L$ -лейцил- $L$ -лейцил- $L$ -лейцин (LeuLeuLeu), нанесенную на поверхность ВОПГ. Была найдена существенная зависимость в морфологии нанокристаллов LeuLeuLeu трипептида от природы паров, Рисунок 17.

Небольшие изменения в морфологии кристаллов LeuLeuLeu были обнаружены после насыщения исходной пленки парами нитрометана (Рисунок 17 С, D), метанола и толуола.

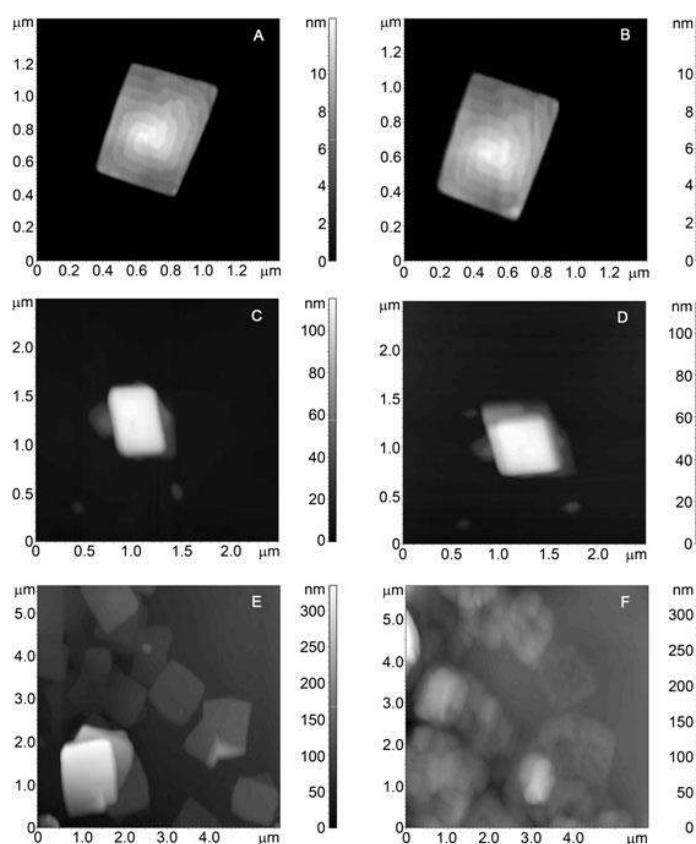


Рисунок 17 – АСМ изображения исходной пленки (А), (С) и (Е) с кристаллами трипепида LeuLeuLeu, нанесенной на ВОПГ, и пленки LeuLeuLeu после насыщения парами воды в течение 92 мин (В), парами нитрометана в течение 17 мин (D) и парами пиридина в течение 110 мин (F) [10]

В этих случаях происходило незначительное расслоение кристаллических агломератов, наблюдалось смещение кристаллов по отношению друг к другу и незначительные отклонения в их поперечных размерах. Насыщение LeuLeuLeu



пленки парами пиридина дает значительное изменение микрокристаллов. Они становятся рыхлыми и бесформенными (Рисунок 17 Е, F).

### 1.5. Свойства и применение наноструктур на основе олигопептидов

Большое разнообразие способов получения наноструктур на основе олигопептидов позволяет создавать материалы с заданными свойствами и морфологией. На основе олигопептидов могут быть получены пористые кристаллы, проявляющие цеолитоподобные свойства, новые биосовместимые материалы, обладающие биологической активностью, повышенной термостабильностью, магнитной восприимчивостью [58], супергидрофобностью и способностью к люминесценции [59].

Благодаря наличию таких свойств материалы на основе олигопептидов находят широкое применение в самых различных отраслях, Рисунок 18.



Рисунок 18 – Применение наноструктур на основе олигопептидов [60]

Так, наноструктуры на основе дипептидов могут быть использованы для хранения энергии, как материалы для дисплеев и светоизлучающих устройств, пьезоэлектрических элементов, супергидрофобных поверхностей, способных к самоочищению, композитной арматуры, каркасов для неорганических ультраструктур, металлоорганических структур, сверхчувствительных сенсоров, высокоэффективных катализаторов [60].

Благодаря таким характеристикам, как хорошая биосовместимость и простота проектирования/синтеза, наноструктуры на основе олигопептидов могут быть эффективными инструментами в области биомедицины [61]. Особенность заключается в способности этих самособирающихся олигопептидов проявлять реакцию на стимулы окружающей среды (внутренние/внешние раздражители), что позволяет контролировать и поддерживать терапевтическое высвобождение в соответствии с требованиями, что является захватывающей перспективой для множества биомедицинских и бионанотехнологий, а также в доставке лекарств [61].

На основе олигопептидов могут быть получены различные нанопровода. Например, в работе [62], сообщается о синтезе гладких монокристаллических нанопроводов на основе цикло(PhePhe), обладающих полупроводниковыми и фотолюминисцентными свойствами (люминесценция при 465 нм). Такие материалы могут быть использованы в различных технологиях, например, в наноэлектронике.

Кроме этого, на основе олигопептидов могут быть получены стабильные физические гидрогели и гидрогелевые наночастицы, что может быть использовано при создании 3D гидрогелевых каркасов для тканевой инженерии, Рисунок 19 [63].

В настоящее время известно, что нанотрубки на основе дипептида дифенилаланин обладают пьезоэлектрическими свойствами, Рисунок 20 [64].

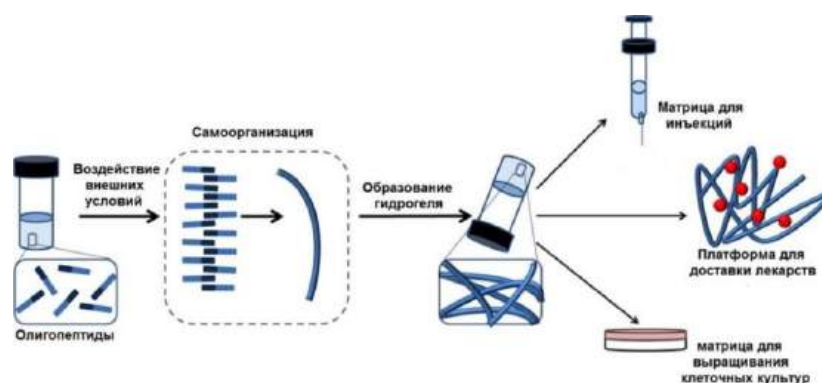


Рисунок 19 – Схематичное изображение процесса образования гидрогеля и различные направления его использования [63]

Этот дипептид – единственный представитель огромного семейства дипептидов, для которого зафиксирован данный эффект. На основе одиночной пептидной трубки PhePhe был продемонстрирован первый прототип пьезорезонатора [64].

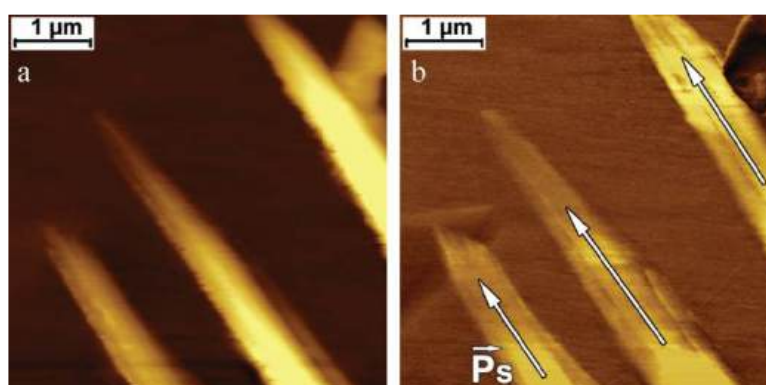


Рисунок 20 – СМПО-изображения микротрубок PhePhe, выращенных после испарения капель: (а) топография, (б) латеральный пьезоэлектрический отклик [64]

Также стоит отметить, что изучаемые структуры могут быть применены в качестве актюаторов в микро- и нанoeлектромеханических системах [64].

Таким образом, наноструктуры на основе олигопептидов, являются перспективными материалами в современной медицине, биоинженерии и наноинженерии.

Проведенный анализ литературных данных показывает, что к настоящему времени исследований, проведенных в этой области, недостаточно и до сих пор не существует подходов к предсказанию и управлению самосборкой олигопептидов.

Также, нет каких-либо данных по механизму формирования кристаллических наноструктур на основе короткоцепных олигопептидов. Для более полного понимания свойств такого материала необходимо более полное исследование его физических свойств и сравнения результатов с уже известными данными.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Материалы

В качестве объектов исследования были использованы глицил-глицин (GlyGly) (Chem-Impex International, #00165, чистота 98.0 – 100 % (анализ титрованием), CAS No: 556-50-3) и глицил-глицил-глицин (GlyGlyGly) (Chem-Impex International, #04555, чистота  $\geq 99\%$  HPLC, CAS No: 556-33-2), 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.

В качестве подложек были использованы атомарно-гладкие, отличающиеся по своим свойствам поверхности: гидрофобный высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ) и гидрофильная слюда. Также, были использованы пластины монокристаллического кремния, отличающиеся по своим свойствам: гидрофобные и гидрофильные. Гидрофильная поверхность кремния была сформирована путем обработки подложки в смеси концентрированной серной кислоты и пероксида водорода (2:3). Гидрофобную поверхность получали пассивацией очищенной кремниевой пластины в растворе плавиковой кислоты. После обработки пластинки кремния промывались дистиллированной водой и осушались в потоке теплого воздуха.

#### *2.1.1. Методика получения пленок олигопептидов на основе глицина.*

Для получения пленок ди- и трипептида на основе глицина использовались растворы с концентрацией 1 мг/мл, приготовленные растворением точной навески олигопептида в смеси метанол-вода (в соотношении 1:1). Аморфные пленки ди- и триглицина получали путем нанесения 40 мкл свежеприготовленного раствора на поверхность ВОПГ и/или слюды с последующим испарением растворителя.

Для получения аморфных пленок олигопептидов на поверхности кремниевых пластин была разработана методика, которая заключалась в

последовательном нанесении 4 порций по 10 мкл свежеприготовленного раствора ди- или трипептида на поверхность кремниевой подложки с промежуточной сушкой каждой порции раствора горячим воздухом (45°C).

### *2.1.2. Методика получения пленок олигопептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин.*

Растворы дипептидов PheLeu и LeuPhe с концентрацией 1 мг/мл и 0.4 мг/мл готовились растворением точной навески дипептида в метаноле (CH<sub>3</sub>OH) и в гексафторизопропанолe (HFIP) соответственно.

Пленки PheLeu и LeuPhe получали путем нанесения 10 мкл свежеприготовленного раствора олигопептида на поверхность кремниевых подложек с последующим испарением растворителя. Сушка раствора на подложке была проведена двумя способами: метод принудительной сушки, который заключается в осушке раствора горячим воздухом и самостоятельное испарение растворителя.

Для получения аморфных пленок олигопептидов PheLeu и LeuPhe использовали метод вращающейся подложки. В этом случае порция раствора наносилась на вращающуюся подложку. Скорость вращения составляла 3000 об/мин.

### *2.1.3. Методика насыщения аморфных пленок олигопептидов парами органических соединений.*

Для насыщения пленок олигопептидов GlyGly и GlyGlyGly парами органических соединений подложку с нанесенной пленкой помещали в чашку Петри, содержащую 200 мкл органического растворителя. Чашку Петри герметизировали и выдерживали при комнатной температуре в течение суток. Непосредственно перед исследованиями пленки осушались в потоке воздуха с температурой 45°C для удаления растворителей.

Для насыщения пленок олигопептидов GlyGly или GlyGlyGly парами, использовались растворители, отличающиеся по физико-химическим свойствам и относящиеся к разным классам органических соединений:

- хлорпроизводные (слабые протонодоноры): хлороформ, дихлорметан;
- азотсодержащие (протоноакцепторы): ацетонитрил, пиридин;
- спирты (протонодоноры): метанол, этанол
- ароматические (слабый протоноакцептор): бензол.

## **2.2. Методы исследования наноструктур на основе олигопептидов**

### *2.2.1. Получение изображений с помощью атомно-силовой микроскопии.*

Морфология поверхности пленок олигопептидов до и после насыщения парами органических соединений исследовалась методом атомно-силовой микроскопии. Изображения АСМ регистрировались с помощью атомно-силового микроскопа Solver P47 Pro (НТ-МДТ, Россия).

После получения АСМ изображения исходных пленок олигопептидов, пленки насыщались парами органических соединений или воды, с последующей осушкой в токе теплого (45°C) воздуха. После обработки пленок снова получали их АСМ изображения.

Измерения проводились на воздухе в полуконтактном режиме с частотой от 114 до 259 кГц и разрешением 512 точек на линию. Использовались стандартные кремниевые кантилеверы NSG-11 (НТ-МДТ, Россия). Для управления микроскопом использовалось программное обеспечение Nova (НТ-МДТ, Россия). Все изображения АСМ были получены при комнатной температуре. Температуру контролировали внешним термометром. Перед визуализацией микроскоп подвергали термическому уравниванию в течение не менее 1 ч. Изображения обрабатывали и анализировали с помощью программы Image Analysis (НТ-МДТ, Россия). Все изображения представлены в виде необработанных данных, за исключением 1D и/или 2D коррекции. Погрешность определения составляет 5% по латеральному размеру и менее 1 нм по высоте.

Измерения начинались через 15–20 мин после установки образцов в измерительную камеру. Время измерения образца варьировалось от 1 до 3 часов.

Среднее квадратичное отклонение  $R_q$  (шероховатость поверхности) пленок определяли по методике, описанной в работе [65].

### 2.2.2. Атомно-силовая спектроскопия (АСС).

Для исследования степени гидрофобности кремния методом АСС был использован микроскоп Solver P47 (НТ-МДТ, Россия). Применялись кремниевые кантилеверы CSG-11 с константой жесткости 0.03 Н/м. Для уменьшения ошибок, связанных с юстировкой и неточностью в определении постоянной упругости кантилевера, серии экспериментов проводились одним и тем же зондом.

### Методология АСС

С помощью атомно-силового микроскопа изучались особенности локального силового взаимодействия зонда с поверхностью. На основании результатов исследований была получена информация о свойствах поверхности различных образцов, в том числе о силе адгезии. Для этого были получены силовые кривые, представляющие собой зависимость величины изгиба кантилевера  $\Delta L$  (сила взаимодействия зонда с поверхностью) от величины перемещения пьезосканера (координата  $Z$ ) при подводе или отводе зонда к образцу или наоборот [66].

Методом атомно-силовой микроскопии в режиме силовой спектроскопии были получены силовые кривые, на основании которых были рассчитаны значения сил адгезии между поверхностью острия иглы микрозонда и поверхностью образца по уравнению:

$$F = k_c * \sigma_c, (1)$$

где  $k_c$  - константа упругости кантилевера,  $\sigma_c$  - отклонение кантилевера, рассчитываемое по уравнению

$$\sigma_c = \Delta L * \frac{1}{\tan \alpha}, (2)$$

где  $\Delta L$  – величина изгиба балки кантилевера при отрыве,  $\alpha$  – угол наклона силовой кривой отвода АСС, характеризующий жесткость образца.



Для уменьшения ошибок, связанных с юстировкой и неточностью в определении постоянной упругости кантилевера, серии экспериментов проводились одним и тем же зондом, при одной и той же юстировке.

### *2.2.3. Силовая микроскопия пьезоэлектрического отклика (СМПО)*

Пьезоэлектрические свойства полученных кристаллов LeuPhe и PheLeu исследовали методом силовой микроскопии пьезоэлектрического отклика (СМПО) на атомно-силовом микроскопе TITANIUM NT-MDT (Зеленоград, Россия) с периодической подачей на иглу переменного напряжения (150 кГц, 0.3 В). Использовались проводящие зонды NSG-01 Au (НТ-МДТ, Россия), имеющие силовую постоянную 1.45–15.1 Н/м и резонансную частоту 87–230 кГц. При сканировании и измерениях в режиме СМПО на зонд подавалось переменное напряжение амплитудой 1–3 В и частотой 150 кГц.

Измерения проводились в режиме контактной моды, то есть кантилевер находился в непосредственном контакте с поверхностью образца и тем самым играл роль «подвижного» верхнего электрода в экспериментах по локальной поляризации поверхности образцов. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Обработка полученных топографических изображений и сигнала СМПО проводилась в программе Image Analysis (NT-MDT, Россия).

### **Методология СМПО**

Одно из важных достоинств атомно-силовой микроскопии заключается в возможности изучения механических и электрических свойств материалов с высоким пространственным разрешением [67]. Для проведения электрических измерений проводящий АСМ зонд подводится к поверхности образца или опускается на нее и в дальнейшем используется в качестве электрода, регистрирующего электростатическую силу, ток, емкость или смещение образца под действием внешнего электрического воздействия [67]. Основная идея метода СМПО заключается в локальном воздействии на пьезоэлектрический образец

переменного электрического поля и последующем анализе результирующих колебаний его под зондом [68-72].

К преимуществам метода СМПО можно отнести высокую чувствительность к локальной поляризации, что позволяет успешно использовать данный метод для изучения пьезоэлектрических характеристик и доменной структуры нанокристаллов на основе олигопептидов на наномасштабном уровне [72].

До появления СМПО для характеристики сегнетоэлектрических материалов приходилось проводить сложную предварительную подготовку образцов, включавшую травление и декорирование [67]. Для СМПО исследований эти процедуры не нужны.

### **Методика измерений в режиме СМПО.**

Для отделения информации о рельефе образца, детектируемой по отклонению зонда АСМ, от данных о пьезоэлектрических свойствах, измерения пьезоотклика от поверхности проводятся при приложении переменного электрического поля с частотой  $\omega$  [73, 74]. То есть, проводящий зонд АСМ приводится в контакт с поверхностью, между зондом и образцом прикладывается переменное напряжение на заданной частоте  $\omega$ , рис. 21, результирующее отклонение зонда содержит постоянную составляющую, по которой восстанавливается рельеф, и переменную составляющую на частоте  $\omega$ , которая отвечает за пьезоотклик поверхности. Следует отметить, что амплитуда переменной составляющей по величине много меньше величины постоянной составляющей сигнала отклонения. Для выделения переменной составляющей отклонения зонда сигнал с четырехсекционного фотодиода подается на синхронный усилитель [74].

Поверхность образца локально расширяется или сжимается в зависимости от направления, прикладываемого с помощью зонда АСМ поля.

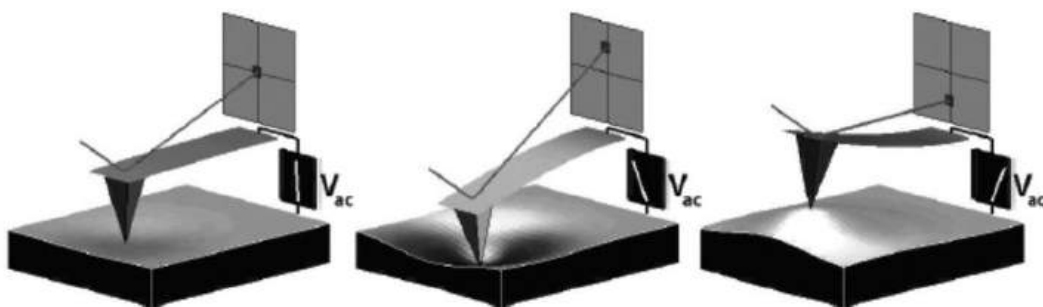


Рисунок 21 – Схема измерений по методике силовой микроскопии пьезоотклика [75]

В свою очередь, локальное изменение размеров образца приводит к отклонению зонда, которое может быть зарегистрировано и интерпретировано в величину пьезоотклика поверхности исследуемого образца

Синхронный усилитель используется для выделения и детектирования сигнала переменного тока. Детектирование возможно даже когда уровень шума существенно выше полезного сигнала. Выделение полезного сигнала на синхронном усилителе происходит по методу фазочувствительного синхронного детектирования на частоте опорного сигнала. В качестве опорного сигнала на фиксированной частоте используется сигнал переменного напряжения, прикладываемого между зондом и образцом. В основе метода детектирования лежит простое перемножение гармонических сигналов. Если опорный сигнал представляет собой синусоидальный сигнал:

$$U_{ref} = A_{ref} \sin(\omega_{ref}t + \varphi_{ref}), (3) [74]$$

а входной сигнал записать как:

$$U_{sig} = A_{sig} \sin(\omega_{sig}t + \varphi_{sig}), (4) [74]$$

то в результате перемножения получается:

$$U_{out} = U_{ref}U_{sig} = A_{ref}A_{sig} \sin(\omega_{sig}t + \varphi_{sig}) \sin(\omega_{ref}t + \varphi_{ref}) = \\ \frac{1}{2}A_{ref}A_{sig}(\cos((\omega_{sig} - \omega_{ref})t) + \varphi_{sig} - \varphi_{ref} - (\cos((\omega_{sig} + \omega_{ref})t) + \varphi_{sig} + \varphi_{ref})), (5) [74]$$

(где:  $\sin x \cdot \sin y = \cos(x - y) - \cos(x + y)$ ).

То есть, на выходе имеются два сигнала - на суммарной ( $\omega_r + \omega_L$ ) и разностных ( $\omega_r - \omega_L$ ) частотах. Если частоты совпадают, то получается сигнал на двойной частоте и сигнал постоянного тока с амплитудой:

$$U_{out} = \frac{1}{2} A_{ref} A_{sig} \cos(\varphi_{sig} - \varphi_{ref}), (6) [74]$$

Таким образом, если отфильтровать составляющую сигнала на удвоенной частоте, то останется сигнал постоянного тока. Как видно из выражения (4), амплитуда выбранного сигнала пропорциональна амплитуде входного сигнала и косинусу смещения этого сигнала, по фазе относительно подаваемого опорного переменного напряжения [74].

Полученная на выходе усилителя синхронного детектора величина детектированного сигнала содержит информацию о значении пьезоотклика с поверхности образца, а фаза определяет направление вектора поляризации исследуемых доменов. Так, для доменов, ориентированных перпендикулярно поверхности с направленной вниз поляризацией, приложение напряжения (плюс напряжения питания при этом подается на зонд) приводит к расширению области под зондом, колебания поверхности будут в фазе с приложенным напряжением, и фаза детектируемого сигнала  $\varphi$  будет равна нулю. Для доменов, ориентированных перпендикулярно поверхности с направленной вверх поляризацией, колебания поверхности будут происходить в противоположной фазе к приложенному напряжению, и разность фаз  $\varphi$  будет равна  $180^\circ$ , Рисунок 22.

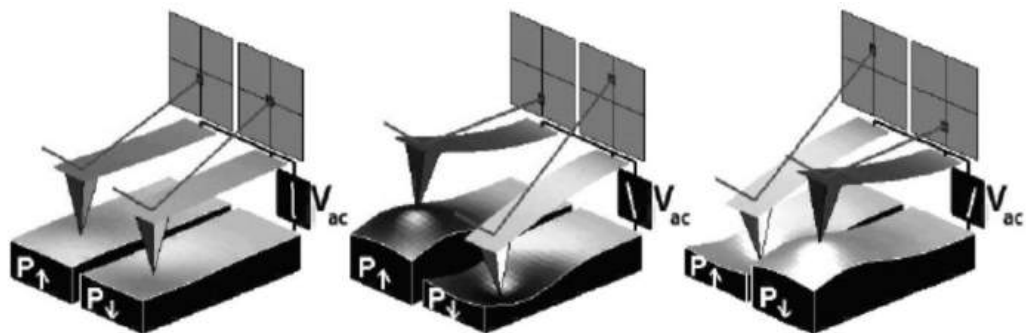


Рисунок 22 – К определению направления вектора поляризации с помощью силовой микроскопии пьезоотклика [75]

Данная конфигурация позволяет регистрировать как вертикальные, так и боковые смещения.

#### *2.2.4. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)*

СЭМ-изображения записывали с помощью автоэмиссионного сканирующего электронного микроскопа высокого разрешения Merlin (Carl Zeiss, Германия) при 5 кВ и 300 пА с целью минимальной модификации образца. На все образцы наносили токопроводящий слой из сплава 80/20 Au/Pd в камере вакуум-аппарата Quorum Q 150T ES. Толщина слоя 15 нм.

#### *2.2.5. Анализ динамического рассеяния света (ДРС)*

Для раствора дипептида глицил-глицин в воде (4 мг на 300 мкл) определяли размер частиц на Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) при 25°C. Прибор содержит гелий-неоновый лазер мощностью 4 мВт, работающий на длине волны 633 нм, и неинвазивную оптику обратного рассеяния. Измерения проводились для каждого раствора не менее трех раз, результаты измерений усреднялись. Перед измерением раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0.45 мкм.

#### *2.2.6. $\zeta$ -потенциал*

$\zeta$ -потенциал измеряли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Образцы готовили так же, как и для измерений ДРС, и переносили с помощью шприца в одноразовую складчатую капиллярную ячейку для измерения.  $\zeta$ -потенциалы были измерены с использованием метода Malvern M3-PALS, а приведенные значения были взяты из среднего значения трех измерений.

#### *2.2.7. Метод распылительной сушки*

Сушилка Nano Spray B90 (Buchi, Швейцария) использовалась в открытом режиме с распылительными головками размером 7.0 мкм, при скорости потока 7 мл мин<sup>-1</sup>, потоке сушильного воздуха 130 л мин<sup>-1</sup> и температуре на входе 95°C. Для

приготовления микросферических частиц использовали раствор GlyGly с концентрацией 1 мг/мл в смеси метанол/вода в соотношении 1:1.

#### *2.2.8. Порошковая рентгеновская дифрактометрия (ПРД)*

ПРД пленок олигопептидов проводили с использованием дифрактометра MiniFlex 600 (Rigaku) с детектором D/teX Ultra. В этом эксперименте использовали  $\text{CuK}\alpha$ -излучение (длина волны 0.15418 нм) и собирали данные при комнатной температуре в диапазоне  $2\theta$  от 5 до 50 с шагом 0.02 и временем экспозиции в каждой точке 0.24 сек без вращения образца. Рабочее напряжение и ток составляли 40 кВ и 15 мА соответственно.  $\text{K}\beta$ -излучение устраняли с помощью Ni-фильтра.

#### *2.2.9. Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС)*

Спектры КРС регистрировались при комнатной температуре на спектрометре ДФС-52 (Россия) в режиме счета фотонов с шагом сканирования  $4 \text{ см}^{-1}$ . Время накопления в точке составляло 20 с. Возбуждение осуществлялось твердотельным лазером с длиной волны 532 нм и мощностью 150 мВт. Спектры аморфных пленок и кристаллов GlyGly на кремниевой подложке регистрировались в геометрии на отражение. Спектр КРС для раствора GlyGly в тетрахлорметане регистрировали в прямоугольной ( $90^\circ$ ) геометрии.

#### *2.2.10. Квантово-химические расчеты*

Квантово-химические расчеты оптимальной геометрии изучаемых молекул в газовой фазе проводились в программном пакете ORCA [76] с использованием метода функционала плотности (DFT) с градиентно-корреляционным функционалом BP [77, 78] и базисным набором SVP [79]. Расчет колебательных частот показал отсутствие мнимой частоты, что является показателем того, что полученная оптимальная геометрия соответствует точке на поверхности потенциальной энергии с минимальной энергией (локальный минимум).

### ГЛАВА 3. САМООРГАНИЗАЦИЯ ОЛИГОПЕПТИДОВ.

В настоящей главе приведены результаты исследования методами АСМ микро- и наноструктур на основе олигопептидов, сформировавшихся в результате воздействия на их тонкие пленки, нанесенные на различные подложки, паров воды и органических соединений.

#### 3.1. Влияние подложки на формирование аморфных пленок олигопептидов

В главе 1 описаны факторы, влияющие на формирование наноструктур на основе олигопептидов. Одним из них является подложка, на которую наносится аморфная пленка олигопептида. Для исследования влияния подложки на морфологию поверхности пленок GlyGly и GlyGlyGly были получены АСМ изображения пленок олигопептидов на различных подложках: ВОПГ, слюда, гидрофильный и гидрофобный кремний, Рисунок 23.

Было установлено, что после нанесения раствора ди- и трипептида глицина на поверхность подложек, таких как ВОПГ и слюда, после самостоятельного высыхания раствора формируются аморфные пленки GlyGly, Рисунок 23а, б, и GlyGlyGly, Рисунок 23в, г, с толщиной  $\sim 100$  нм [A1, A2].

В случае дипептида, Рисунок 23а, б, среднеквадратическая шероховатость ( $R_q$ ) скан  $10 \times 10$  мкм<sup>2</sup> составляет  $1.2 \pm 0.1$  нм (ВОПГ) и  $4.0 \pm 0.2$  нм (слюда) для скана  $7 \times 7$  мкм<sup>2</sup>. Круглые объекты, наблюдаемые на поверхности пленок, нанесенных на ВОПГ и слюду, могут быть результатом образования пузырьков при испарении растворителя [A1].

В случае GlyGlyGly на поверхности ВОПГ среднеквадратичная шероховатость на скане  $10 \times 10$  мкм составляет  $\sim 5.8 \pm 0.1$  нм, Рисунок 23в, на поверхности слюды среднеквадратичная шероховатость на скане составила  $\sim 1.35 \pm 0.4$  нм, Рисунок 23г [A2].

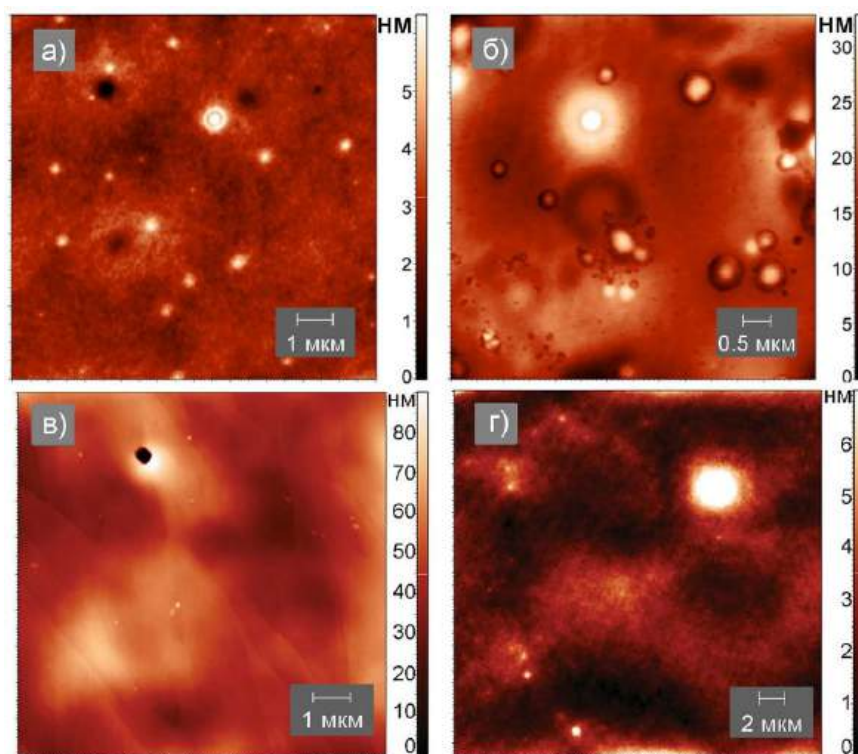


Рисунок 23 – АСМ изображения пленок (а, б) GlyGly и (в, г) GlyGlyGly, нанесенных на (а, в) ВОПГ и (б, г) слюду из раствора в смеси вода/метанол с концентрацией 1 мг/мл [A1, A2]

Было установлено, что на поверхности кремниевых пластин при самостоятельном испарении раствора аморфные пленки ди- и трипептида не образуются. Нанесение раствора GlyGly на подложку приводит к формированию мелких продолговатых объектов с зауженным концом (как у длиннозерного риса) длиной 200–600 нм и шириной в средней части 100–200 нм, Рисунок 24 а [A1].

Для управления морфологией пленок и получения различных типов наноструктур на их поверхности больше подходят аморфные пленки, так как они обладают избыточной энергией по сравнению с кристаллами. Простая обработка таких пленок парами воды или органического соединения приводит к формированию на их поверхности микро- и наноструктур [A1, 80, 10]. Поэтому, в настоящей работе была разработана методика получения аморфной пленки GlyGly и GlyGlyGly на поверхности кремниевой подложки, Рисунок 24б. Для этого сразу после нанесения капли раствора на подложку её обдували теплым воздухом (45°C)



до образования пленки (далее принудительный способ сушки). В результате была получена аморфная пленка GlyGly, Рисунок 24б, в [A1].

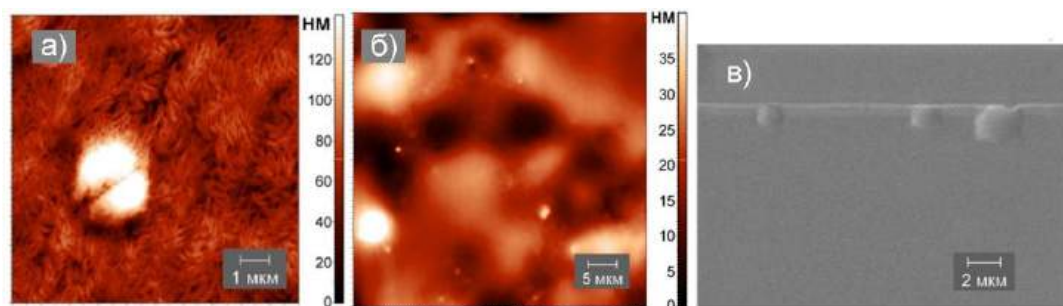


Рисунок 24 – (а, б) АСМ и (в) СЭМ изображения пленки дипептида после (а) самостоятельного высыхания и (б, в) принудительной сушки раствора дипептида на кремниевой подложке

Значение  $R_q$  для скана  $50 \times 50 \text{ мкм}^2$  составляет  $7.6 \pm 0.3 \text{ нм}$ . Выпуклые объекты, подобные наблюдаемым в пленках, нанесенных на ВОПГ и слюде, были обнаружены на поверхности пленки методами АСМ, Рисунок 24б, и СЭМ, Рисунок 24в [A1]. Возможность получения аморфных пленок является одним из преимуществ GlyGly и GlyGlyGly по сравнению с глицином, для которого до сих пор аморфная пленка не была получена [81].

Наблюдаемое влияние подложки на морфологию пленки может быть обусловлено несколькими причинами. Хаотическое расположение молекул дипептида, характерное для аморфной пленки, на поверхности ВОПГ, Рисунок 25а, обусловлено отсутствием сильных взаимодействий (водородная связь, электростатические взаимодействия) между атомами поверхности ВОПГ и молекулами GlyGly и GlyGlyGly, необходимые для инициации зародышеобразования. Отрицательный заряд на поверхности слюды, во-первых, обеспечивает ее хорошую смачиваемость и образование практически двумерной пленки, во-вторых, препятствует свободному перемещению молекул GlyGly и GlyGlyGly, находящихся в цвиттер-ионной форме, из-за сильного электростатического взаимодействия, Рисунок 25б. В результате на поверхности слюды образуется аморфная пленка [A1, A2].

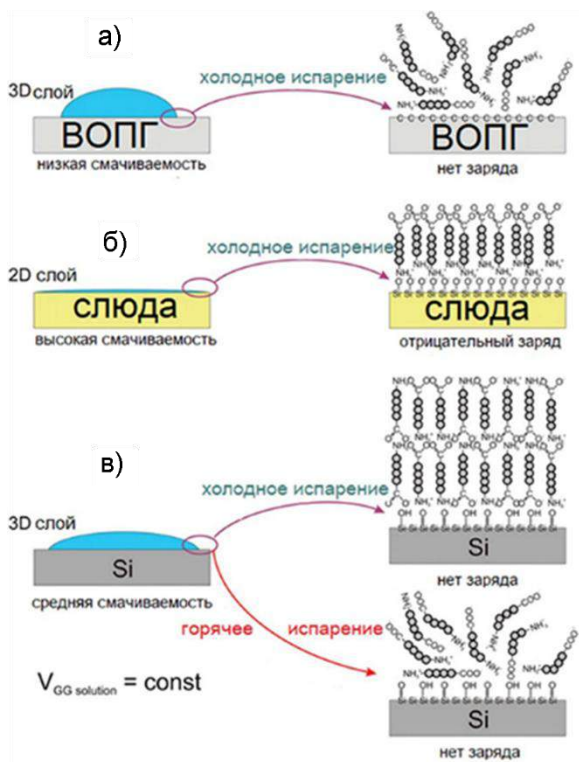


Рисунок 25 – Схема возможной организации молекул GlyGly и GlyGlyGly на различных поверхностях [A1]

На поверхности кремниевой пластины присутствуют оксиды и гидроксильные группы, способные эффективно адсорбировать молекулы ди- и трипептида, Рисунок 25в. А с учетом того, что в плоскости кристаллов GlyGly или GlyGlyGly (001) находятся заряженные карбо-анионная ( $-\text{COO}^-$ ) и аммонийная ( $-\text{NH}_3^+$ ) группы, Рисунок 26. Поверхностные соединения кремния могут ориентировать молекулы ди- и трипептида в пространстве за счет взаимодействия с заряженными группами  $-\text{COO}^-$  и  $-\text{NH}_3^+$ . В результате возможен рост плоских кристаллов перпендикулярно поверхности подложки. Такое ориентационное влияние заряженных групп кристалла аминокислоты на молекулы воды было показано ранее [80]. Также, следует отметить, что слюда вызывает коллапс сферических наноансамблей на основе короткоцепных олигопептидов, тогда как ВОПГ не влияет на их форму [A1, 81].

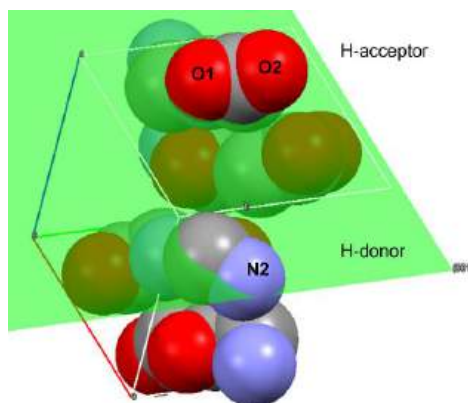


Рисунок 26 – Заряженные карбо-анионная ( $-\text{COO}^-$ ) и аммонийная ( $-\text{NH}_3^+$ ) группы в плоскости (001) кристаллов GlyGly или GlyGlyGly

Для более детального сравнения влияния подложек на морфологию поверхности пленок ди- и трипептида было проведено дополнительное исследование влияния степени гидрофобности одного типа подложки: кремния. С помощью специальной обработки, описанной в главе 1, был получен кремния с гидрофильной и гидрофобной поверхностью [A3].

АСМ изображения пленок ди- и трипептида на основе глицина на поверхности монокристаллического кремния, отличающегося степенью гидрофобности показаны на Рисунке 27. Было установлено, что при самопроизвольном высыхании растворов GlyGly и GlyGlyGly на поверхности кремния формируются кристаллические структуры [A1]. Для получения аморфных пленок GlyGly и GlyGlyGly на поверхности гидрофильного и гидрофобного кремния использовали разработанную методику принудительной сушки [A1].

Согласно полученным данным на поверхности гидрофильного кремния GlyGly образует более гладкую пленку, Рисунок 27а, чем GlyGlyGly, Рисунок 27в. Разброс по высоте в случае дипептида более чем в 10 раз меньше, чем для трипептида. На поверхности пленки GlyGlyGly присутствуют впадины, образовавшиеся в следствии коллапса пузырьков при испарении растворителя, глубиной до 100 нм [A3].

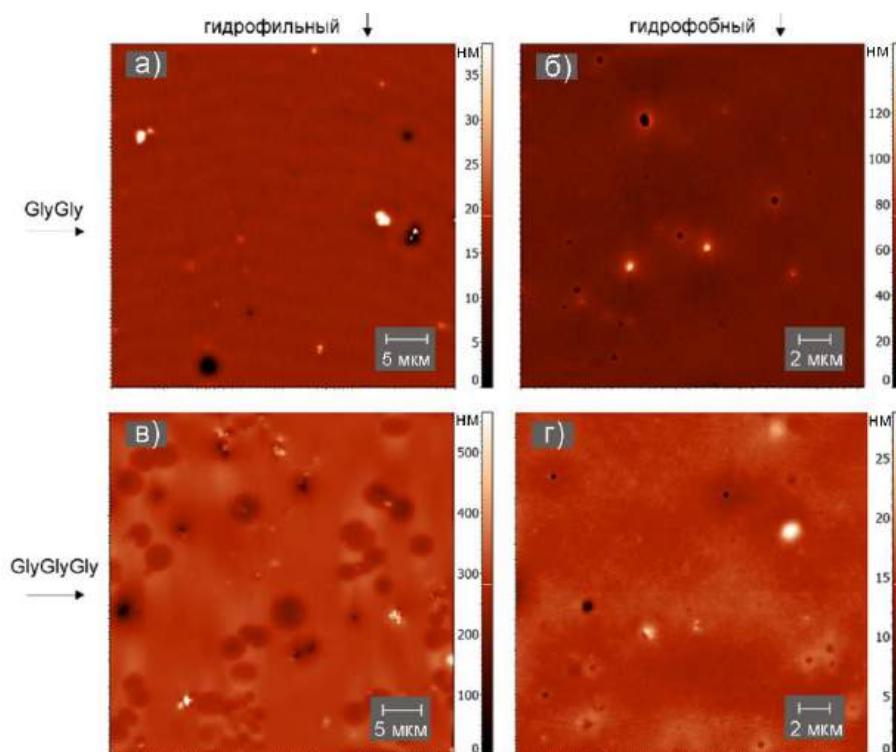


Рисунок 27 – АСМ изображения пленок (а, б) GlyGly и (в, г) GlyGlyGly на (а, в) гидрофильном и (б, г) гидрофобном кремнии после принудительной сушки [A3]

Для гидрофобной подложки наблюдается обратная картина – разброс по высоте для GlyGlyGly в 5 раз меньше, чем для GlyGly, рис 27б, г. На обеих плёнках наблюдаются аналогичные впадины [A3].

Так как все экспериментальные данные были получены в условиях контакта раствором и пленок с окружающим воздухом, необходимо было дополнительно исследовать влияние влажности на самосборку олигопептидов для учета возможного влияния паров воды. Для этого аморфные пленки GlyGly и GlyGlyGly, нанесенные на поверхность гидрофильного и гидрофобного кремния, были выдержаны на воздухе в течение суток. Было установлено, что морфология поверхности пленок не изменяется, образование каких-либо структур не происходит, Рисунок 28. На поверхности пленок сохраняются впадины, присутствующие на исходных пленках, Рисунок 26. Таким образом, пары воды, присутствующие в воздухе, не способны инициировать процессы самосборки изученных олигопептидов даже по прошествии суток [A3].

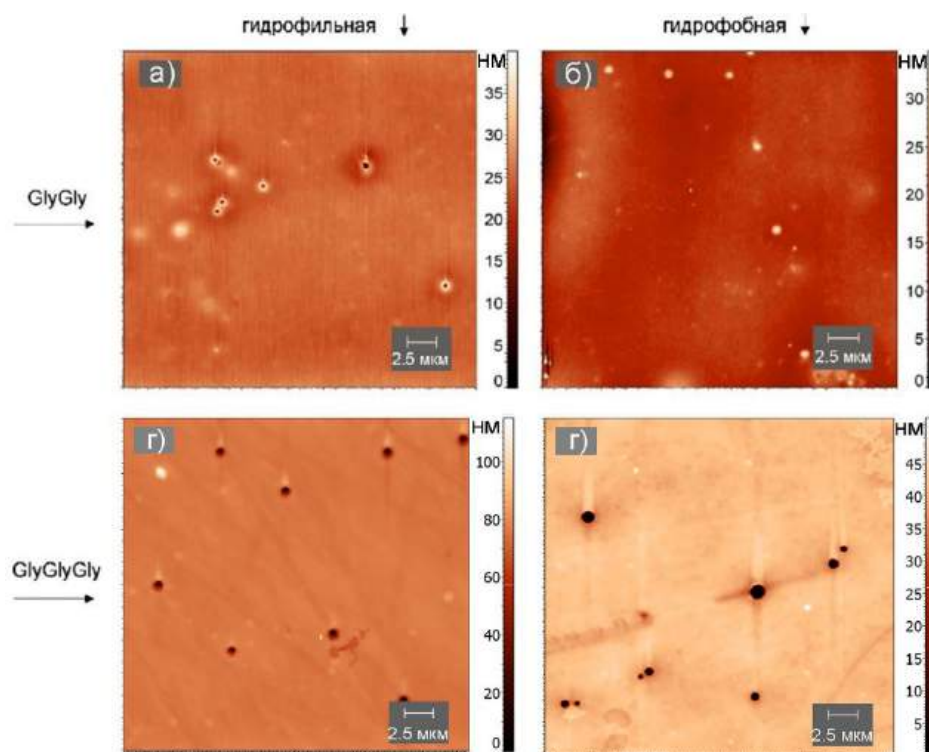


Рисунок 28 – АСМ изображения пленок (а, б) GlyGly и (в, г) GlyGlyGly на гидрофильном (а, в) и (б, г) гидрофобном кремнии после выдерживания на воздухе в течение суток [A3]

Таким образом, в настоящей работе впервые методом атомно-силовой микроскопии проведено изучение результатов самосборки дипептида глицил-глицин и трипептида глицил-глицил-глицин в тонких пленках, нанесенных на поверхность ВОПГ, слюды, а также пластин монокристаллического кремния: гидрофильного и гидрофобного. Разработана методика получения аморфных пленок олигопептидов GlyGly и GlyGlyGly на изученных подложках: ВОПГ, слюда, кремний.

### 3.2. Влияние паров органических соединений на самосборку олигопептидов в тонкой пленке.

На следующем этапе работы полученные аморфные пленки олигопептидов были использованы для формирования на их поверхности микро- и наноразмерных структур. С этой целью аморфные пленки GlyGly и GlyGlyGly, нанесенные на различные подложки, насыщали парами органических соединений: дихлорметан;



ацетонитрил, пиридин; метанол, этанол, бензол, с термодинамической активностью  $P/P_0 = 1$  в герметичных системах не менее 1 часа.

Полученные АСМ и СЭМ изображения пленок после взаимодействия представлены на Рисунках 29–37.

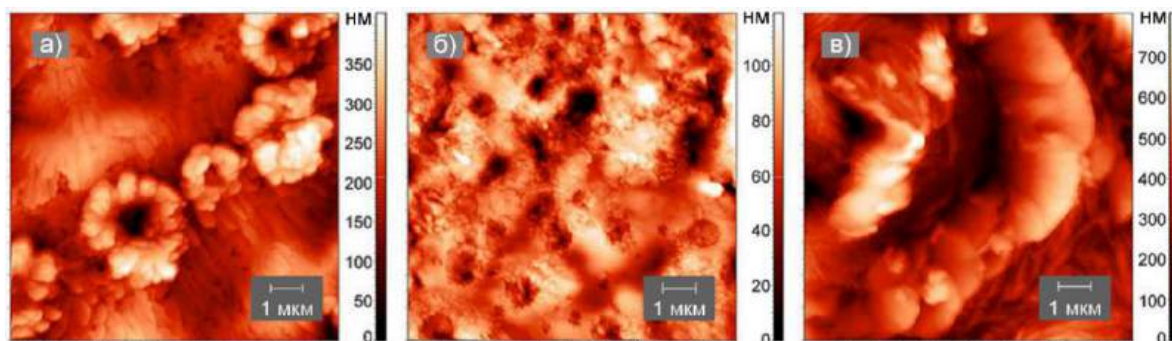


Рисунок 29 – АСМ изображения пленки GlyGly, нанесенной на ВОПГ (а), слюду (б) и кремний (в) после насыщения парами метанола. Термодинамическая активность паров метанола  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A1]

Насыщение пленок дипептида парами метанола приводило к образованию пластинчатых кристаллов, характерных для  $\alpha$ -фазы GlyGly [82], Рисунок 29. Рост кристаллов происходит как в плоскости поверхности пленки (плоскость XY), так и под углом к поверхности. На поверхности ВОПГ формируются цветкообразные структуры диаметром 1.5–4 мкм, Рисунок 29а. «Лепестки цветка» состоят из кристаллов длиной 250–1000 нм, шириной 150–400 нм и толщиной 15–140 нм. На поверхности слюды образуется пленка, состоящая из кристаллов длиной 100–600 нм и шириной 90–250 нм, Рисунок 29б. На поверхности кремния образуются кристаллы высотой 70–200 нм и шириной 150–400 нм в верхней грани, а также более крупные плоские кристаллы шириной 1–2.5 мкм, Рисунок 29в [A1].

Более подробно эта пленка была охарактеризована с помощью метода СЭМ, Рисунок 30. Судя по полученным изображениям, на поверхности присутствуют относительно небольшие кристаллы длиной 200–5 мкм и шириной 200–1.5 мкм [A1]. Кристаллы организованы в виде дуг или окружностей, которые видны и на АСМ изображении, Рисунок 29в.

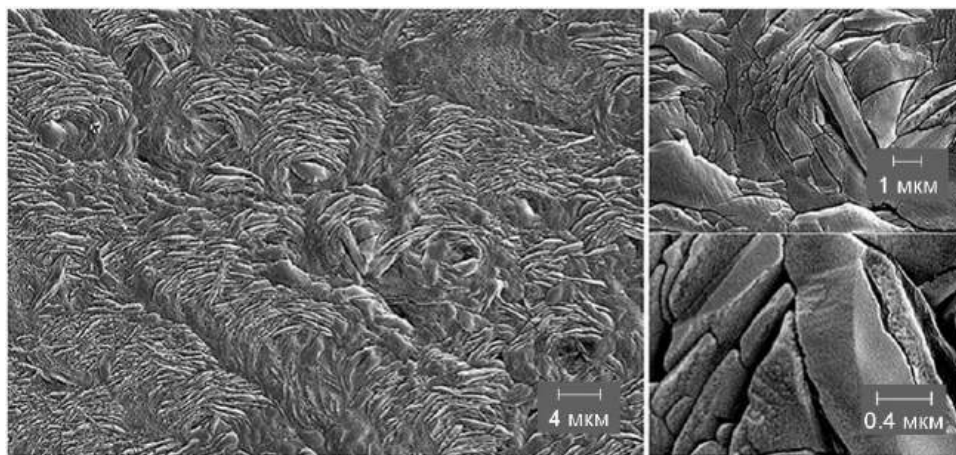


Рисунок 30 – СЭМ изображения пленки GlyGly, нанесенной на кремний, после насыщения парами метанола с разным увеличением. Термодинамическая активность паров метанола  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A1]

Насыщение дипептидной пленки, нанесенной на ВОПГ, парами этанола приводило к образованию удлиненных кристаллов длиной 150–250 нм и толщиной 25–40 нм, Рисунок 31а. Также наблюдались чешуйчатые кристаллы длиной 350–600 нм, шириной 200–400 нм и толщиной 5–80 нм, образующие мозаичную структуру, Рисунок 31б [A1]. На пленке, нанесенной на слюду, формируются широкие пластинчатые кристаллы толщиной 20–60 нм и шириной в широкой части 0.5–1.0 мкм, Рисунок 31в. В большинстве случаев кристаллы располагаются параллельно или под небольшим углом к поверхности подложки, как и в случае системы «дипептид-метанол», Рисунок 31б [A1]. На поверхности кремния формируются структуры двух типов. Первые представляют собой чешуйчатые образования с четко очерченными границами, Рисунок 31г. Для них характерно радиальное расположение по отношению к центру (полости) окружности. Вблизи центра эти кристаллы имеют ширину 200–550 нм и длину 2 мкм. Второй тип структур представляет собой террасу шириной 1.5–4 мкм, на границе которой располагаются вытянутые узкие кристаллы длиной 0.4–3 мкм и шириной 100–450 нм, Рисунок 31д [A1].

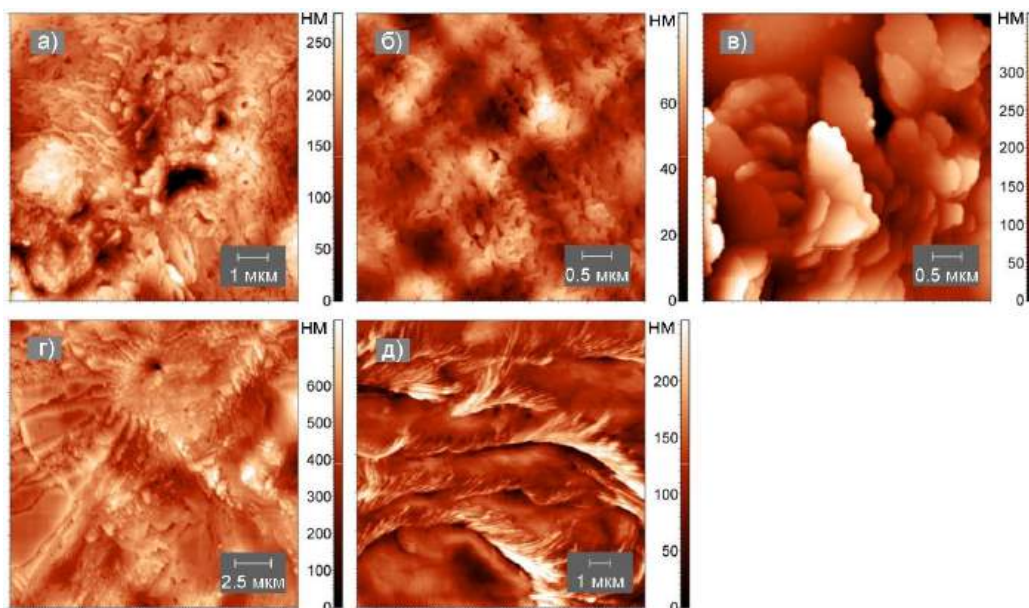


Рисунок 31 – АСМ изображения пленки GlyGly, нанесенной на ВОПГ (а, б), слюду (в) и кремний (г, д) после насыщения парами этанола. Термодинамическая активность паров этанола  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A1]

Дендритные структуры GlyGly, сформированные на кремниевой подложке, также были охарактеризованы с помощью СЭМ, Рисунок 32. Обнаружены складчатые структуры, похожие на двойной веер, Рисунок 32а. Складки образованы хорошо выраженными удлиненными пластинками длиной до 36 мкм и шириной от 100 до 400 нм [A1].

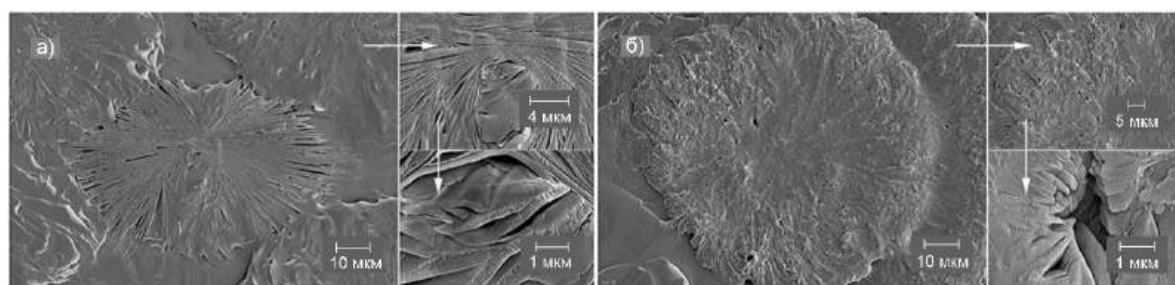


Рисунок 32 – СЭМ изображения двух мест (а, б) пленки GlyGly, нанесенной на кремний, после насыщения парами этанола, с разным увеличением. Термодинамическая активность паров этанола  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A1]



Также были обнаружены округлые дендритные структуры диаметром более 80 мкм, Рисунок 32б. Из-за плотного переплетения и взаимопроникновения ветвей видны только основные ветви, выходящие из центра [A1].

Большее разнообразие морфологии объектов, получаемых при использовании этанола, по сравнению с метанолом, может быть связано с разными физико-химическими свойствами этих растворителей. Простыми отличиями являются их температура кипения и энтальпия испарения при 298 К: для метанола  $T = 337.8 \text{ К}$ ,  $\Delta_{\text{vap}}H^{298} = 37.50 \text{ кДж моль}^{-1}$  и для этанола  $T = 351.5 \text{ К}$ ,  $\Delta_{\text{vap}}H^{298} = 42.41 \text{ кДж моль}^{-1}$  [83]. В результате давление пара над каплей водно-метанольного раствора выше, чем водно-этанольного раствора [84]. Это является причиной более быстрого испарения метанола и пересыщения раствора дипептидом. Зародыши не могут превратиться в крупные кристаллы из-за отсутствия достаточного времени для роста. В случае этанольного раствора более продолжительное время испарения позволяет формировать протяженные и разнообразные структуры [A1].

Сильные изменения морфологии пленок, нанесенных на все типы подложек, наблюдались после их насыщения парами пиридина, Рисунок 33. На ВОПГ обнаружены крупные дендритные кристаллы, похожие на снежинки, Рисунок 33а. Лучи снежинки состоят из плоских кристаллов, расположенных перпендикулярно плоскости подложки, длиной до 25 мкм, Рисунок 33б [A1].

На поверхности крупных дендритных кристаллов с длиной ветвей до 35 мкм образовались более мелкие ветви длиной 1–10 мкм. На поверхности слюды сформировались кристаллические структуры, напоминающие раковины гребешка, Рисунок 33в, г. На поверхности кремниевой подложки образовались чешуйчатые структуры, Рисунок 33д, е. Плоские пластины равномерно расположены на поверхности пленки, Рисунок 16д, или образуют вытянутые террасы, Рисунок 33е. Чешуйки имеют ширину 50–300 нм и возвышаются над поверхностью пленки на 3–20 нм. Террасы имеют ступенчатую поверхность и состоят из тонких чешуек длиной 50–500 нм и толщиной 0.5–1 нм. Толщина этих ступенек соответствует размерам элементарной ячейки кристалла GlyGly [A1].

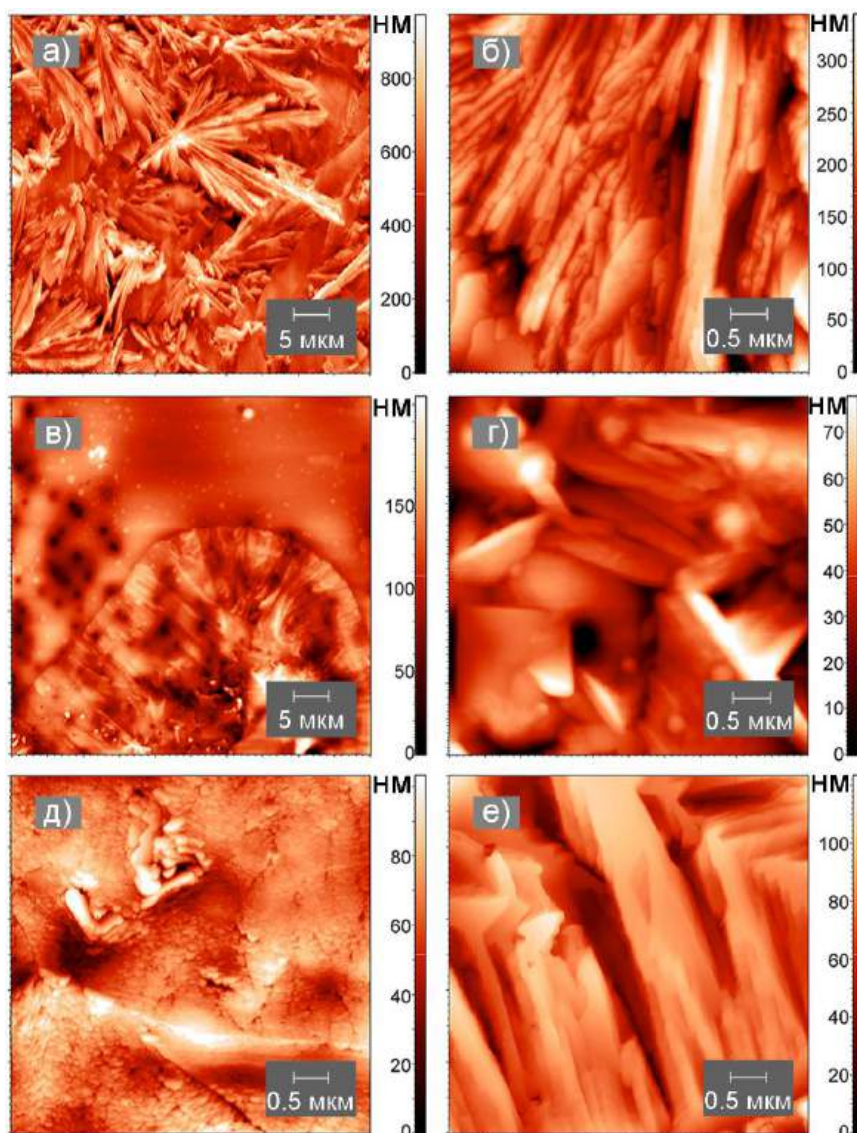


Рисунок 33 – АСМ изображения пленки GlyGly, нанесенной на ВОПГ (а, б), слюду (в, г) и кремний (д, е) после насыщения парами пиридина.

Термодинамическая активность паров пиридина  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A1]

Насыщение пленки GlyGly парами слабого протоноакцептора ацетонитрила приводит к образованию на поверхности ВОПГ кристаллических объектов различных размеров и форм, Рисунок 34а. Встречаются четко очерченные прямоугольные кристаллы длиной до 2 мкм, шириной до 1.4 мкм и высотой до 315 нм [A1]. Не обнаружено влияния на морфологию пленки, нанесенной на поверхность слюды, Рисунок 34б. На кремнии сформировались структуры, подобные ячеистому материалу, Рисунок 34в. Они состоят из элементов длиной 370–2.5 мкм и толщиной 100–200 нм. Можно предположить, что такая поверхность

будет обладать лучшими сорбционными свойствами, чем исходная пленка, а также лучшей растворимостью по сравнению с крупными кристаллами дипептида [A1].

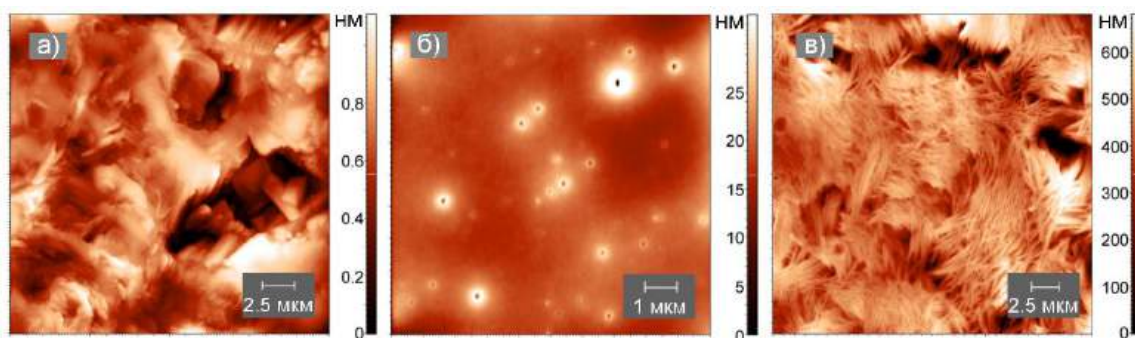


Рисунок 34 – АСМ изображения морфологии пленки GlyGly, нанесенной на ВОПГ (а), слюду (б) и кремний (в) после насыщения парами ацетонитрила.

Термодинамическая активность паров ацетонитрила  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A1]

Полученные результаты показывают, что слюда препятствует образованию структур на поверхности аморфной пленки GlyGly при взаимодействии с парами органических соединений (антагонистический эффект) в отличие от ВОПГ и кремния (аддитивный эффект). Такое сопротивление подложки преодолевается сильными протонодонорами (метанол, этанол) и протоноакцепторами (пиридин).

Процесс реорганизации пленки дипептида при постоянной температуре, очевидно, состоит из нескольких стадий, Рисунок 35 [A1]: (1) адсорбция паров органических веществ на поверхности пленки, (2) конденсация паров (многослойная адсорбция) с образованием микро- или нанокapли, (3) частичное растворение аморфной пленки в каплях с образованием пересыщенного раствора, (4) образование зародышей кристаллизации в пересыщенном растворе, (5) дальнейший рост кристаллов (структур).

Лучшая растворимость аморфного состояния по сравнению с кристаллическим состоянием [85, 86] обеспечивает смещение равновесия в процессе (3) в сторону образования зародышей (4). Аналогичный механизм можно предположить и для полиморфных переходов супрамолекулярных рецепторов [87] или лекарств [88], насыщенных парами [A1].

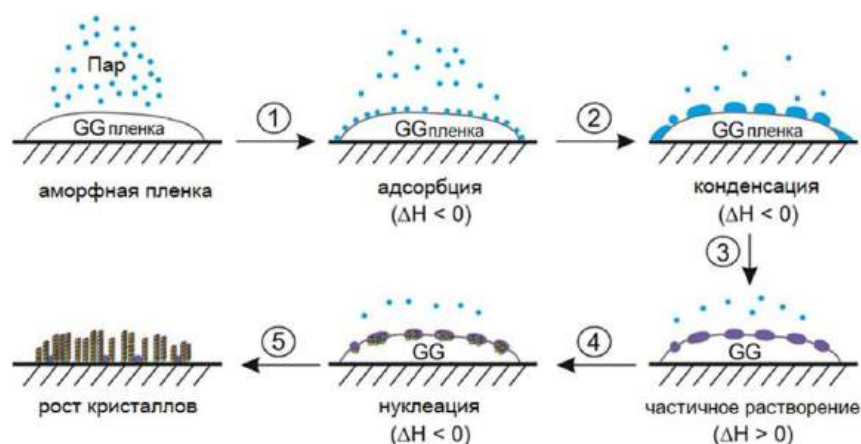


Рисунок 35 – Схема возможного механизма самосборки GlyGly в аморфной пленке, инициируемой паром [A1]

Была предпринята попытка ответить на вопрос: «почему не все исследованные органические растворители приводили к явной кристаллизации аморфной пленки дипептида?» [A1]. Очевидно, что изменение морфологии пленки требует эффективного взаимодействия растворителя и дипептида, иначе процесс (3) не будет реализован. Для характеристики используемых растворителей применялись параметры растворимости Хансена (HSP), включающие дисперсионную ( $\delta_D$ ), полярную ( $\delta_P$ ), водородную ( $\delta_H$ ) составляющие [89], Таблица 1. Параметр растворимости «расстояние» ( $R_a$ ), который может использоваться для описания взаимодействия дипептида с растворителями, трудно рассчитать из-за цвиттер-ионной формы GlyGly [A1].

Была обнаружена корреляция между параметром полярного взаимодействия растворителя  $\delta_P$  и влиянием паров органических соединений на морфологию поверхности тонкой пленки дипептида. Исследуемые растворители можно разделить на две группы, Рисунок 36. 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 случае этой подложки, для самосборки олигопептидов важнее способность растворителей образовывать водородные связи в качестве доноров протонов [A1].

Таблица 1. Параметры растворимости Хансена [89].

Растворитель	$\delta_D$	$\delta_p$	$\delta_h$
CH <sub>3</sub> OH	15.10	12.30	22.30
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	15.80	8.80	19.40
CHCl <sub>3</sub>	17.80	3.10	5.70
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	18.20	6.30	6.10
CH <sub>3</sub> CN	15.30	18.00	6.10
C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	19.00	8.80	5.90

Тем не менее, хлороформ с  $\delta_p = 3.1$  оказывает незначительное влияние на морфологию пленки дипептида. Этот факт может быть связан с наличием следов воды ( $\delta_p = 16$ ) в хлороформе, что может привести к существенному изменению свойств среды [89, 90].

Обнаруженная связь между результатами АСМ и параметрами Хансена свидетельствует о том, что растворители с  $\delta_p = 0$ , например, алканы или арены, не будут влиять на морфологию пленки GlyGly. В то же время взаимодействие с парами воды  $\delta_p = 16$  должно приводить к сильным изменениям морфологии.

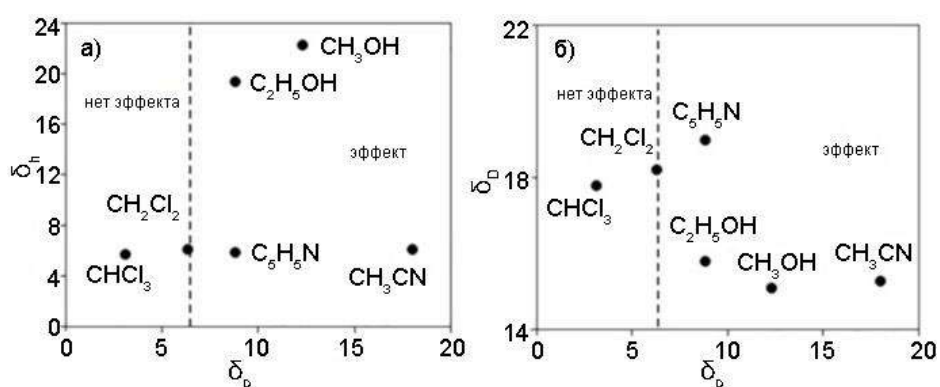


Рисунок 36 – Отношения между параметрами Хансена для исследованных органических растворителей: (а)  $\delta_h$  от  $\delta_p$  и (б)  $\delta_D$  от  $\delta_p$  [A1]

Далее было проведено исследование влияния паров на морфологию пленки трипептида GlyGlyGly, нанесенной на различные подложки [A2]. Было



установлено, что после взаимодействия пленки, нанесенной на поверхность ВОПГ, с парами метанола формируются неориентированные слоистые кристаллические структуры, имеющие различную форму и размеры. Насыщение пленки трипептида парами этанола приводит к формированию узких кристаллов длиной до 450 нм и шириной 118–370 нм в случае ВОПГ, Рисунок 37а, и слоистых кристаллических структур и прямоугольных кристаллов длиной от 500 нм до 1.3 мкм, шириной от 300 нм до 1.2 мкм на поверхности слюды, Рисунок 37б [А2].

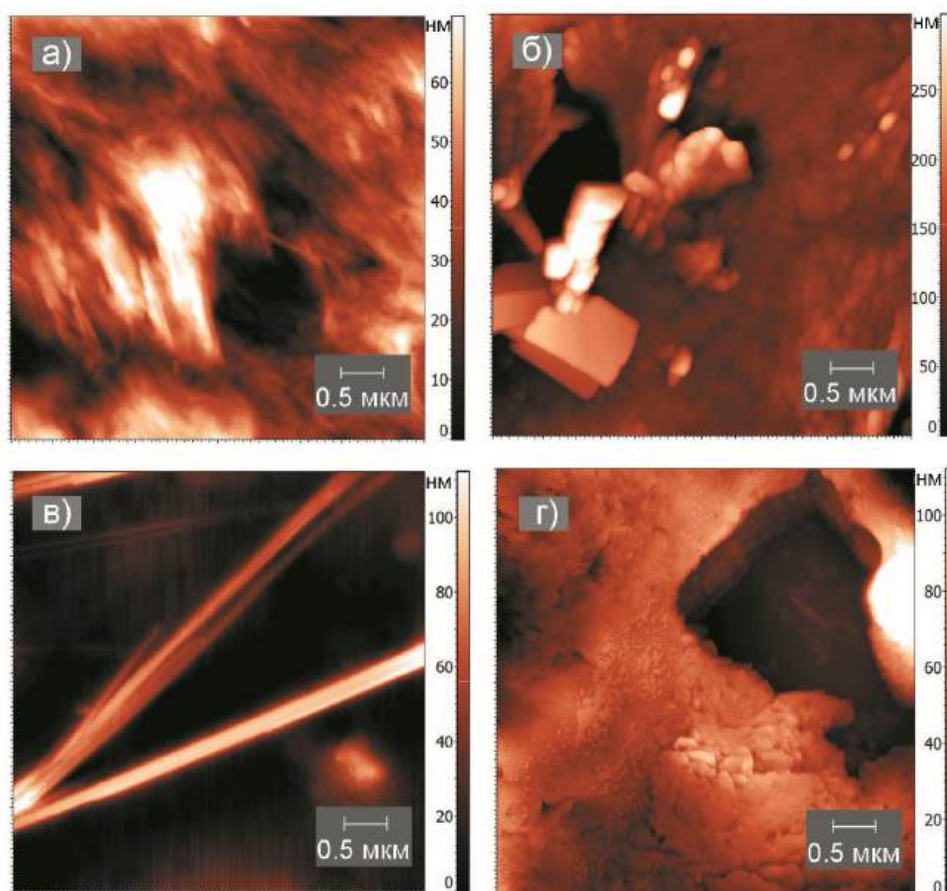


Рисунок 37 – АСМ изображения пленок GlyGlyGly, нанесенных на ВОПГ (а, в) и слюду (б, г), после насыщения парами этанола (а, б) и воды (в, г).

Термодинамическая активность паров этанола  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [А2]

После насыщения парами воды на поверхности пленки трипептида на ВОПГ были обнаружены протяженные кристаллы длиной до 40 мкм высотой от 10 до 70 нм, Рисунок 37в [А2]. Значительное изменение морфологии поверхности аморфной пленки GlyGlyGly под действием паров воды хорошо согласуется с данными по

сорбции, полученными методом кварцевых микровесов [10], согласно которым тонкая пленка трипептида, нанесенная на поверхность металлических электродов, способна эффективно связывать воду, но обладает относительно низкой емкостью по отношению к спиртам. Следует также отметить, что влияние паров на морфологию пленок олигопептидов, нанесенных на ВОПГ и поверхность кварцевого резонатора, покрытую слоем золота, одинаково [91].

На поверхности аморфной пленки GlyGlyGly, нанесенной на слюду, после воздействия паров воды были обнаружены слоистые кристаллы, Рисунок 37г. Ширина чешуек составляет от 50 до 150 нм, высота от 30 до 100 нм [A2].

Результаты взаимодействия паров органических соединений с тонкими пленками олигопептидов, нанесенных на различные подложки, согласуются с величинами краевого угла смачивания  $\theta$  используемых подложек, Таблица 2. Для сравнения в Таблица 2 приведены значения краевых углов смачивания поверхности окисленного кремния, который также является широко используемой подложкой при изучении органических наноструктур методами зондовой микроскопии [91]. Как видно из Таблицы 2, краевые углы смачивания поверхностей ВОПГ и золота имеют близкие значения, но существенно отличаются от величины краевого угла для слюды [A2]. По-видимому, более гидрофобный характер поверхности этих подложек и отсутствие сильных взаимодействий с молекулами олигопептидов обеспечивает возможность их самосборки под действием паров. В случае слюды для процесса переупаковки молекул олигопептидов в твердой фазе требуется затратить больше энергии для преодоления адгезии [A2].

Таблица 2. Значения краевых углов смачивания различных подложек [A2].

Подложка	Краевой угол $\theta$ , град
ВОПГ (свежий скол)	$68.2 \pm 1.6$ [92]
ВОПГ	$\sim 90$ [92], $91.0 \pm 2.5$ [93]
Золото	40–80 [94, 95]
Слюда	$>1$ [96], $>30$ [97]
Окисленный кремний	$\sim 17$ [98], $22 \pm 1$ [99]

Для изучения состояния тонких пленок трипептида до и после взаимодействия с парами были получены дифрактограммы пленок, полученных на поверхности подложек, и пленок, насыщенных парами воды и этанола, Рисунок 38 [A2].

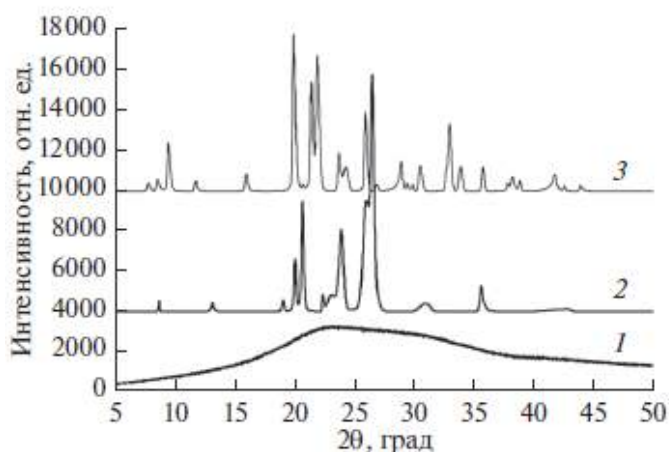


Рисунок 38 – Дифрактограммы пленки GlyGlyGly, полученной на поверхности ВОПГ при быстром испарении растворителя (кривая 1), пленки GlyGlyGly после насыщения парами этанола (кривая 2) и парами воды (кривая 3) [A2]

Согласно полученным данным, на поверхности изученных подложек в условиях быстрого испарения растворителя формируются аморфные пленки, Рисунок 38, кривая 1. На дифрактограмме присутствует широкое «галло», характерное для аморфных веществ. В результате взаимодействия аморфной пленки GlyGlyGly с насыщенным паром этанола и воды происходит ее кристаллизация, Рисунок 38, кривые 2 и 3. Следует отметить, что кристаллическая упаковка трипептида в полученных продуктах насыщения различается. Дифрактограмма образца GlyGlyGly, насыщенного этанолом, содержит интенсивные пики при значениях  $2\theta$ , равных  $20^\circ$ ,  $20.6^\circ$ ,  $23.9^\circ$ ,  $25.9^\circ$ ,  $26.5^\circ$  и  $35.6^\circ$ , Рисунок 38, кривая 2. В то время как на дифрактограмме образца GlyGlyGly, насыщенного парами воды, присутствуют интенсивные пики при углах  $19.9^\circ$ ,  $21.4^\circ$ ,  $21.9^\circ$ ,  $23.7^\circ$ ,  $25.9^\circ$ ,  $28.9^\circ$ ,  $30.4^\circ$ ,  $32.4^\circ$ ,  $33.8^\circ$  и  $35.7^\circ$ , Рисунок 38, кривая 3. Результаты порошковой дифрактометрии согласуются с данными, полученными методом



АСМ, которые показывают, что на поверхности пленок GlyGlyGly под влиянием воды и этанола образуются различные структуры: небольшие узкие кристаллы в случае этанола и длинные кристаллы в случае воды, Рисунок 37 [A2].

Насыщение пленки GlyGlyGly парами пиридина приводит к значительному изменению ее морфологии, Рисунок 39 [A2].

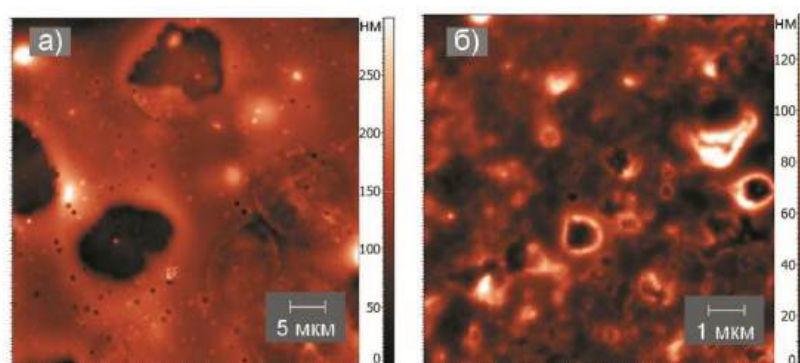


Рисунок 39 – АСМ изображение пленки GlyGlyGly, нанесенной на ВОПГ (а), слюду (б), после насыщения парами пиридина. Термодинамическая активность паров пиридина  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A2]

В случае ВОПГ, Рисунок 39, пленка частично набухает, на ней формируются округлые объекты диаметром  $\sim 1$  мкм, выступающие над поверхностью пленки на 10–30 нм, и плоские кристаллические структуры, похожие на листья дерева, диаметром от 10 до 20 мкм, а также скопления мелких кристалликов, длина и толщина которых составляет от 500 нм до 1 мкм от 500 до 700 нм соответственно [A2].

В случае слюды, Рисунок 39, на пленке формируются округлые объекты, напоминающие по форме кратеры диаметром от 500 нм до 2 мкм и высотой жерла от 250 до 500 нм. В последнем случае можно предположить обычное набухание пленки без ее кристаллизации [A2].

Насыщение пленки, нанесенной на ВОПГ, парами бензола приводит к образованию на ее поверхности кристаллических наноструктур шестигранной дендритной формы, Рисунок 40а. Обнаруженные наноструктуры состоят из нановолокон длиной от 10 до 60 нм, толщиной от 60 до 250 нм. Влияние бензола,

неспособного к сильным межмолекулярным взаимодействиям с трипептидом, на морфологию пленки GlyGlyGly может быть результатом хорошего смачивания поверхности гидрофобного пирографита [100] и образования тонкой прослойки между слоем трипептида и подложкой.

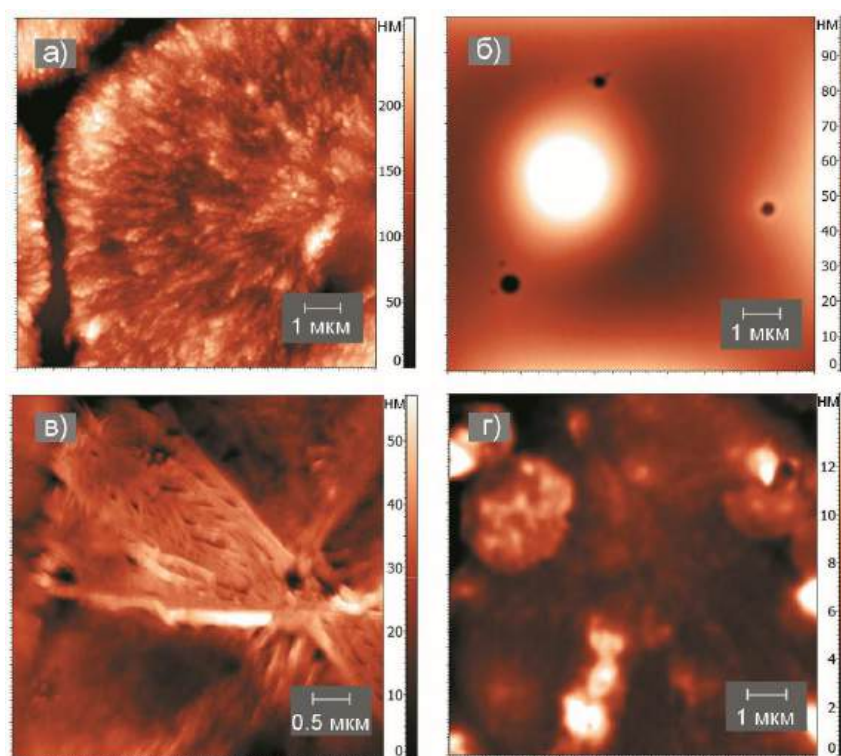


Рисунок 40 – АСМ изображение пленки GlyGlyGly, нанесенной на ВОПГ (а, в) слюду (б, г), после насыщения парами бензола (а, б) и дихлорметана (в, г).

Термодинамическая активность паров бензола и дихлорметана  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$   
[A2]

В результате этого подвижность молекул трипептида увеличивается и происходит кристаллизация. Насыщение пленки, нанесенной на слюду, парами бензола приводит к ее выравниванию и формированию пор глубиной более 70 нм, Рисунок 40б. По-видимому, в данном случае большую роль играют взаимодействия GlyGlyGly с подложкой. На слюде, способной за счет электростатического взаимодействия или водородных связей прочно удерживать молекулы трипептида, воздействие паров бензола не приводит к формированию наноструктур [A2].

При насыщении аморфной пленки трипептида парами дихлорметана, неспособного к сильным специфическим взаимодействиям с GlyGlyGly, используемая подложка оказывает существенное влияние на конечный результат, Рисунок 40в, г. При использовании в качестве подложки слюды, Рисунок 40г, пленка GlyGlyGly после взаимодействия с дихлорметаном набухает, а в некоторых случаях на ее поверхности образуются разрывы глубиной до 150 нм. Насыщение парами дихлорметана пленки GlyGlyGly, нанесенной на поверхность ВОПГ, Рисунок 40в, приводит к формированию кристаллических структур, исходящих в виде расширяющихся лучей из единого центра длиной от 3 мкм. Можно предположить, что механизм этого влияния тот же, что и в случае бензола [A2].

Для более детального изучения влияния подложки на самосборку пленок дипептида и трипептида под действием паров органических соединений были использованы пластинки гидрофильного и гидрофобного кремния [A3].

Полученные АСМ изображения пленки GlyGly и GlyGlyGly нанесенные на гидрофильный и гидрофобный кремний после насыщения парами протоноакцептора пиридина и протонодонора этанола приведены на Рисунке 41, 42 [A3].

Пары пиридина оказывают значительное влияние на морфологию поверхности пленки дипептида, нанесенную как на гидрофильный, Рисунок 41а, так и на гидрофобный кремний, Рисунок 41б. В первом случае, на поверхности формируются округлые объекты диаметром 0.3–0.7 мкм, Рисунок 41а. В то время как на поверхности гидрофобного кремния образуются протяженные слоистые структуры GlyGly, толщина слоев около 0.1 мкм, с крупными плоскими кристаллами на поверхности длиной 0.4–0.7 мкм и шириной 0.2–0.4 мкм, Рисунок 41б [A3].

На гидрофильном кремнии под действием пиридина происходит самосборка GlyGlyGly с образованием кристаллов двух типов: мелких до 0.3 мкм, и крупных длиной до 3 мкм, Рисунок 41в. При этом сохраняется фаза аморфной пленки. После насыщения пленки GlyGlyGly на поверхности гидрофобного кремния образуются мелкие структуры от 100 нм до 700 нм, Рисунок 41г [A3].

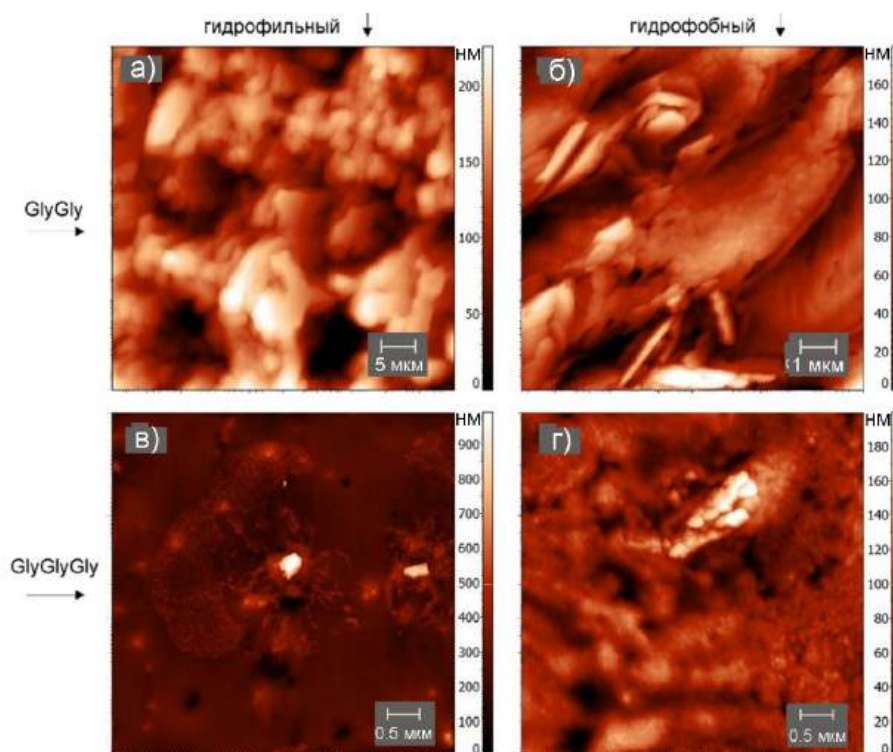


Рисунок 41 – АСМ изображения пленок (а, б) GlyGly и (в, г) GlyGlyGly на гидрофильном (а, в) и (б, г) гидрофобном кремнии после насыщения парами пиридина. Термодинамическая активность паров пиридина  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A3]

При насыщении парами этанола пленок ди- и трипептида, нанесенных на гидрофильный или гидрофобный кремний, происходит их самосборка с образованием кристаллических структур, Рисунок 42. Следует отметить, что на гидрофильном кремнии самосборка GlyGly и GlyGlyGly начинается с зародыша и рост кристаллов происходит в радиальном направлении, Рисунок 42а, в. Вследствие этого, образующиеся структуры имеют треугольную форму. На гидрофобном кремнии в обоих случаях формируется двухфазная система, состоящая из крупных кристаллов с длиной до 4.5 мкм и мелких с длиной от 0.2 мкм до 0.6 мкм, Рисунок 42б, г [A3].

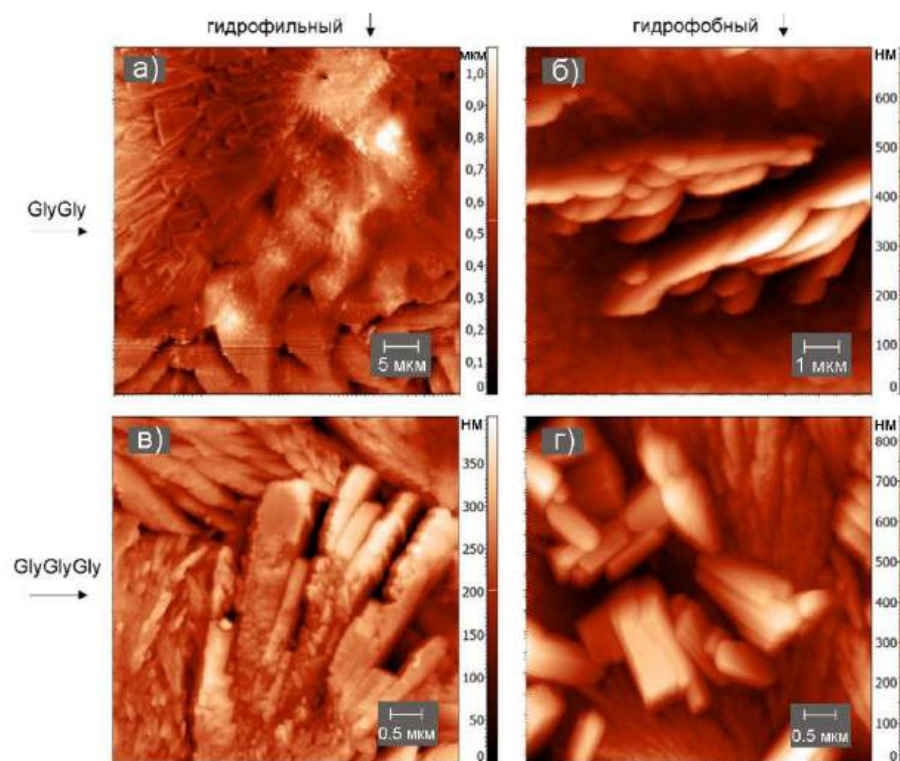


Рисунок 42 – АСМ изображения пленок (а, б) GlyGly и (в, г) GlyGlyGly на гидрофильном (а, в) и (б, г) гидрофобном кремнии после насыщения парами этанола. Термодинамическая активность паров этанола  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [А3]

При насыщении пленки GlyGly, нанесенной на разные подложки, парами слабого протоноакцептора ацетонитрила наблюдается формирование совершенно разных по форме структур. На гидрофильном кремнии образуются узкие, вытянутые ворсоподобные кристаллические структуры длиной 0.4–2 мкм, Рисунок 43а, в то время как на гидрофобном кремнии – крупные кристаллические структуры похожие на ветви с иголками длиной от 0.4 мкм до 2 мкм, Рисунок 43б [А3].

Пары ацетонитрила на морфологию пленки трипептида на гидрофильном кремнии практически не оказывают влияния, Рисунок 43в. Значительный эффект ацетонитрила наблюдается после насыщения его парами пленки GlyGlyGly, нанесенной на гидрофобный кремний, Рисунок 43г. Разброс по высоте увеличивается до 0.8 мкм. На поверхности образуются как волокнообразные структуры, так и хорошо очерченные кристаллы длиной от 1 мкм до 3.5 мкм [А3].

Таким образом, при использовании слабого протоноакцептора количество аминокислотных остатков в молекуле олигопептида оказывает значительное



влияние на результат самосборки. При использовании гидрофильной подложки ацетонитрил оказывается не способен инициировать процесс самосборки трипептида.

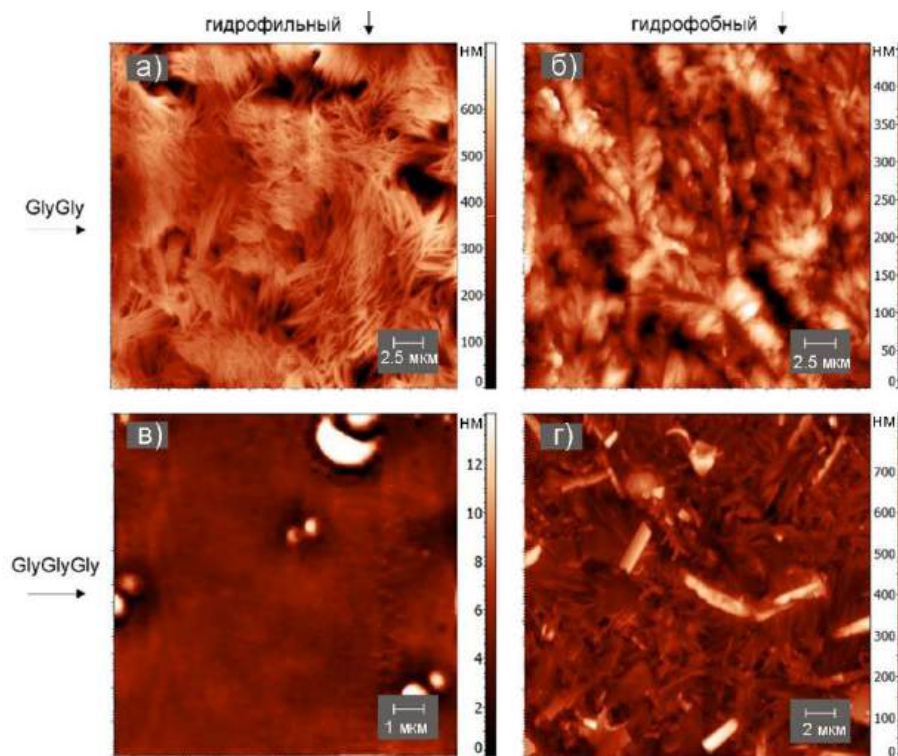


Рисунок 43 – АСМ изображения пленок (а, б) GlyGly и (в, г) GlyGlyGly на гидрофильном (а, в) и (б, г) гидрофобном кремнии после насыщения парами ацетонитрила. Термодинамическая активность паров ацетонитрила  $P/P_0 = 1$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  [A3]

В связи с тем, что на некоторых пленках кристаллические структуры вырастали неравномерно и оставались области похожие на аморфные пленки было предложено использовать метод атомно силовой спектроскопии (АСС) для уточнения информации по полученным структурам и сравнения силы адгезии формирующихся нанокристаллов с начальными аморфными пленками.

Методом атомно-силовой спектроскопии (АСС) были получены силовые кривые, рис 44, на основании которых рассчитана сила адгезии  $F_{\text{адг}}$  полученных микро- и наноструктур к зонду [A3].

Для аморфных пленок GlyGly и GlyGlyGly, вне зависимости от типа подложки, она составляет 100–120 нН. После насыщения парами ацетонитрила пленки GlyGlyGly на гидрофильной подложке, Рисунок 43в, сила адгезии составила 160 нН. Небольшое увеличение значения по сравнению с аморфной пленкой, по-видимому, связано с ее набуханием в процессе взаимодействия с парами. На гидрофобной подложке по данным АСМ наблюдается формирование кристаллов трипептида, Рисунок 43г, и величина силы адгезии значительно уменьшается – до 50 нН [А3].

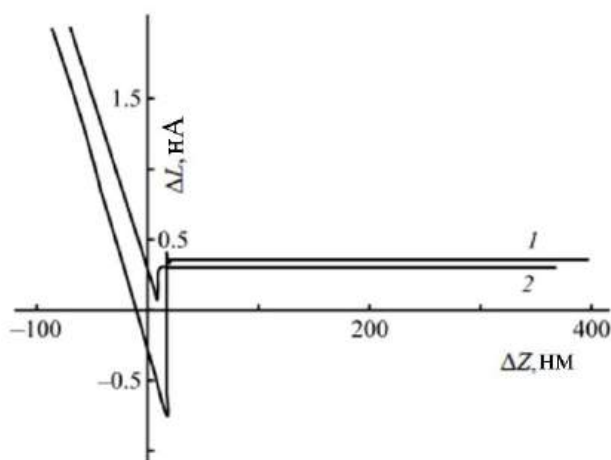


Рисунок 44 – Кривые атомно-силовой спектроскопии для аморфной (1) пленки GlyGlyGly и пленки GlyGlyGly после насыщения парами этанола (2), нанесенных на гидрофильный кремний [А3]

Таким образом, установлено, что для аморфных пленок величина силы адгезии составляет 100–120 нН. При набухании пленки в парах растворителей сила адгезии возрастает. При кристаллизации аморфных пленок величина силы адгезии уменьшается, что хорошо коррелирует с данными АСМ [А3]. Полученные результаты демонстрируют возможность применения метода АСС для определения степени кристалличности наноструктур на основе олигопептидов, нанесенных на различные поверхности [А3].

В настоящей работе впервые методом атомно-силовой микроскопии проведено изучение результатов самосборки дипептида GlyGly и трипептида

GlyGlyGly в тонких пленках, нанесенных на поверхность гидрофильного и гидрофобного кремния, под действием паров органических соединений. Установлено, что в результате воздействия паров сильного протонодонора этанола и протоноакцептора пиридина на поверхности пленок ди- и трипептида происходит формирование различных микро- и наноструктур вне зависимости от типа используемой подложки. Форма образующихся структур зависит от природы паров, используемых для насыщения пленок.

При воздействии паров слабого протонакцептора ацетонитрила на тонкие пленки изученных олигопептидов существенное влияние на результат самосборки оказывает количество аминокислотных остатков в молекулах олигопептидов, а также степень гидрофобности используемой подложки. Так, на поверхности пленки дипептида, нанесенной на гидрофильный или гидрофобный кремний, под действием паров ацетонитрила формируются кристаллические структуры, в то время как для трипептида самосборка практически отсутствует. При этом, в случае дипептида форма наноструктур, полученных на гидрофильном и гидрофобном кремнии, различается. В случае же пленок ди- и трипептида глицина нанесенных на поверхность гидрофильной слюды не происходит существенного изменения морфологии поверхности начальных пленок, под действием паров слабых протонодоноров и протоноакцепторов.

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.

### **3.3. Главный фактор самосборки дипептида глицил-глицин.**

Важнейшим свойством органических соединений, используемых для инициирования самосборки олигопептидов, которое необходимо учитывать, является их способность образовывать водородные связи. Поэтому даже следовые количества других соединений, присутствующих в системе и обладающих иной способностью к межмолекулярным взаимодействиям, могут резко изменить



направление процесса самосборки. Мы полагаем, что эта проблема особенно касается молекул воды, поскольку они всегда присутствует в воздухе и в жидких органических средах, не подвергшихся специальной подготовке.

Например, известно, что добавление воды к растворам олигопептидов на основе фенилаланина (PhePhe) приводит к изменению формы образующихся структур: вместо наносфер и везикул формируются нанотрубки и нанопровода [100]. Cyclo(LeuLeu) может образовывать необычные гели с гидрофобными органическими растворителями в присутствии следов воды [90]. Вместе с тем следует отметить, что, как правило, авторы не учитывают присутствие следовых количеств других соединений, в том числе и воды.

При исследовании влияния ряда паров на морфологию поверхности аморфной пленки было обнаружено, что тип и форма кристаллических структур иногда не воспроизводится в последовательных экспериментах. Было предположено, что самосборка дипептидов весьма чувствительна к влажности воздуха и используемых органических соединений.

### *3.3.1. Самосборка дипептида глицил-глицин инициируемая взаимодействием со смесью паров воды и органических соединений*

Аморфная пленка GlyGly, приготовленная на гидрофильной кремниевой подложке из раствора в смеси вода/метанол по методике, описанной в главе 2, была охарактеризована с помощью АСМ, Рисунок 27а. Далее была исследована самосборка GlyGly при насыщении парами протонодонорного хлороформа ( $\text{CHCl}_3$ ), апротонных растворителей дихлорметана ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) и тетрахлорметана ( $\text{CCl}_4$ ), а также гидрофобного бензола ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ) в присутствии и отсутствие паров воды. Было установлено, что на поверхности аморфных пленок GlyGly после взаимодействия с парами этих соединений при влажности ~0% какие-либо упорядоченные структуры не образуются, Рисунок 45а, б, в. Насыщение пленки парами бензола приводит к ее набуханию и частичному растворению, Рисунок 45г [A4].

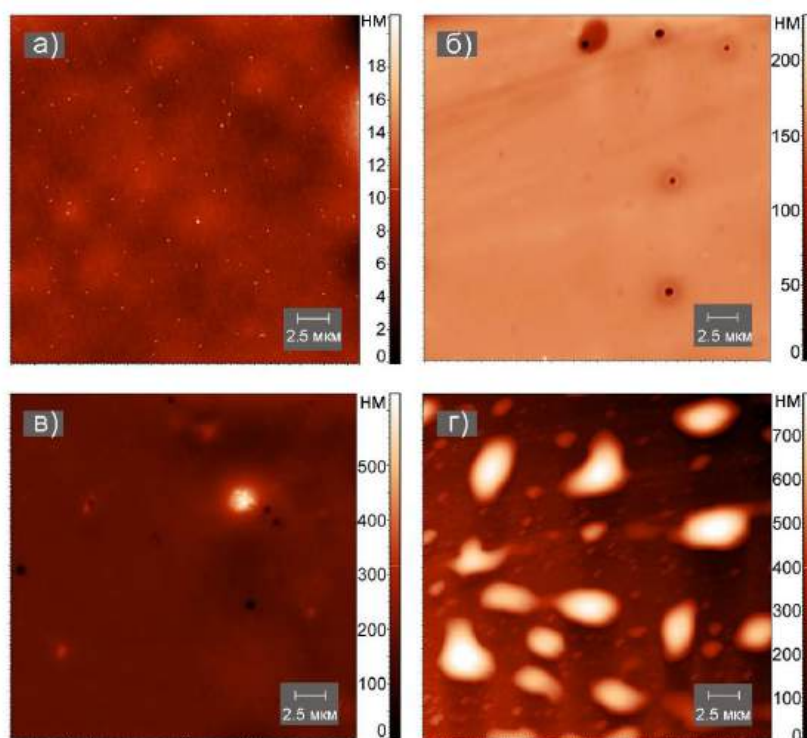


Рисунок 45 – АСМ изображения пленок GlyGly, нанесенных на кремниевую подложку после насыщения парами  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (а),  $\text{CHCl}_3$  (б),  $\text{CCl}_4$  (в) и  $\text{C}_6\text{H}_6$  (г) в течение 24 часов [А4]

Насыщение пленки парами смеси дихлорметан/вода в течение 10 мин не привело к изменению морфологии ее поверхности, Рисунок 46а. Частичное растворение пленки GlyGly обнаружено в системе хлороформ/вода, Рисунок 46г. В то время как уже после 10 мин насыщения пленки парами тетрахлорметана или бензола в присутствии такого же количества воды начинают формироваться кристаллические структуры, Рисунок 46ж, к. В случае паров бензола образуются вытянутые кристаллы длиной от 20 до 40 мкм и шириной 0.5–1 мкм, Рисунок 46к. Короткие кристаллы имеют длину менее 5 мкм, средняя высота кристаллов колеблется от 20 до 80 нм. На поверхности кристаллов имеются поры диаметром от 200 до 500 нм и глубиной от 10 до 30 нм. Подобные поры были обнаружены ранее при насыщении пленки глицил-глицил-глицина на поверхности высокоориентированного пиролитического графита парами пиридина. В системе с парами тетрахлорметана, Рисунок 46ж, формируется складчатая структура, состоящая из не полностью сформировавшихся узких кристаллов длиной от 0.5 до

4 мкм. Некоторые структуры имеют угловую форму. Можно предположить, что в последнем случае была получена двухфазная система кристаллы/аморфная часть [A4].

Увеличение времени экспозиции пленки GlyGly в парах смеси до 30 мин приводит к дальнейшему развитию структур на основе дипептида, Рисунок 46б, д, з, л. В случае дихлорметана и хлороформа на поверхности аморфной пленки появляются кристаллические структуры, Рисунок 46б, д. Подобные структуры ранее были обнаружены на поверхности пленки GlyGly, нанесенной на ВОПГ после ее взаимодействия с парами пиридина. В результате увеличения времени насыщения пленки смесью паров бензола и воды узкие кристаллы, Рисунок 46к, объединяются в более крупные структуры, Рисунок 46л. Общий разброс по высоте на скане  $30 \times 30$  мкм увеличивается с 200 нм, Рисунок 44 к, до 300 нм, Рисунок 46к. При этом поры и их размеры на поверхности кристалла сохраняются. В системе с парами тетрахлорметана обнаружено образование более длинных кристаллов до 10 мкм, Рисунок 46з [A4].

Увеличение времени насыщения до 60 мин приводит к образованию хорошо сформированных структур во всех исследованных системах, кроме дихлорметана, Рисунок 46в, е, и, м. После насыщения парами дихлорметана в присутствии воды пленка структурируется, на поверхности образуются узкие кристаллы шириной от 250 до 500 нм и длиной от 2 до 6 мкм, Рисунок 46в [A4].

После насыщения парами хлороформа/воды формируются шиповидные структуры, Рисунок 46е. На поверхности кристаллов имеются поры диаметром около 300 нм и глубиной от 10 до 30 нм. Разброс по высоте на скане  $30 \times 30$  мкм увеличивается до 450 нм [A4].

После насыщения парами бензола/воды кристаллы приобрели более гладкую структуру, почти все поры сузились, Рисунок 46м. В случае тетрахлорметана увеличение времени насыщения с 30 до 60 мин не приводит к существенному изменению формы кристаллов. На поверхности пленки также присутствуют вытянутые и угловые структуры, Рисунок 46и [A4].

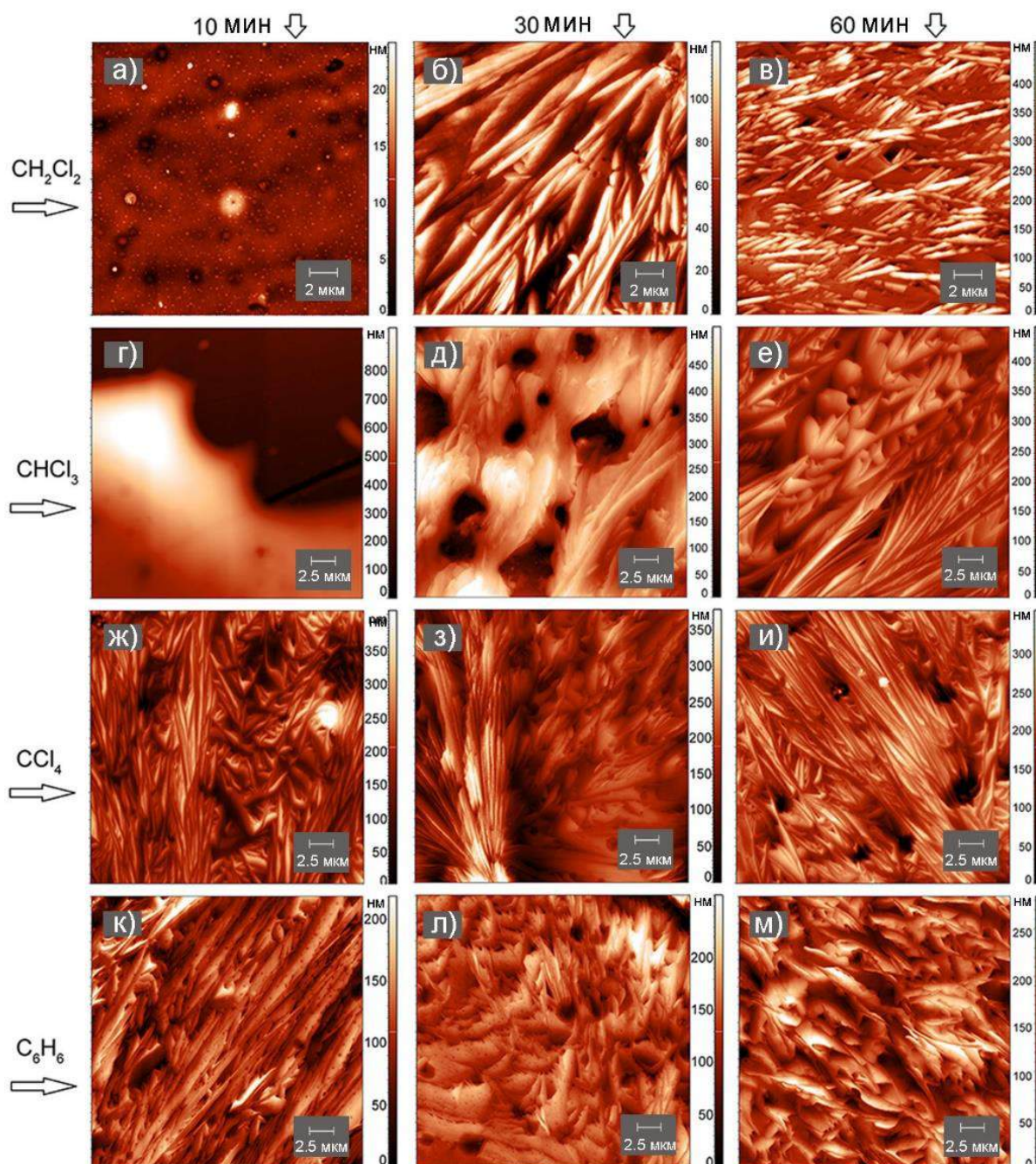


Рисунок 46 – АСМ изображения поверхности пленок GlyGly после насыщения в течение 10 мин (а, г, ж, к), 30 мин (б, д, з, л) и 60 мин (в, е, и, м) парами смеси органическое соединение (а, б, в)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , (г, д, е)  $\text{CHCl}_3$ , (ж, з, и)  $\text{CCl}_4$  и (к, л, м)  $\text{C}_6\text{H}_6$  и вода (20:1 по объему растворитель:вода), 40:1 об./об. для дихлорметана)

[A4]

Полученные результаты показывают (1) пары воды инициируют самосборку GlyGly в тонкой пленке; (2) скорость самосборки GlyGly при взаимодействии с



парами смеси бензол/вода и тетрахлорметан/вода выше, чем в системе со смесями дихлорметан/вода и хлороформ/вода [A4].

Для подтверждения образования кристаллов на поверхности аморфных пленок дипептида после взаимодействия с парами воды использовали метод порошковой рентгеновской дифрактометрии. Однако, получить качественные дифрактограммы для тонких пленок, аналогичные тем, которые исследовались методом АСМ, не удалось. С другой стороны, увеличение концентрации раствора дипептида позволяет получить более толстые пленки, но кристаллизация дипептида происходит даже при быстром высыхании капель. Поэтому процесс самосборки дипептида в тонких пленках был смоделирован взаимодействием аморфного порошка GlyGly с парами.

Для этого методом распылительной сушки [101] был получен порошок GlyGly. По данным ПРД полученный порошок был аморфным, что подтверждается характерным гало на дифрактограмме, кривая (а) Рисунок 47. Было показано, что аморфная фаза сохраняется после насыщения порошка GlyGly парами тетрахлорметана в течение 1 ч в присутствии осушителя, кривая (б) на Рисунке 47.

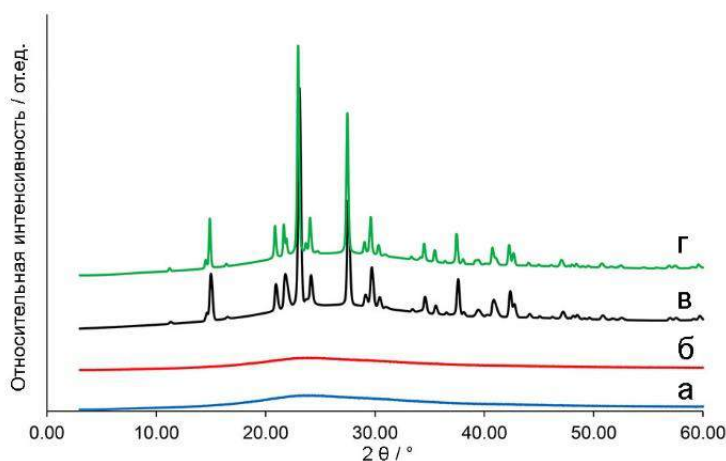


Рисунок 47 – ПРД-граммы порошка GlyGly до (а) и после насыщения парами (б)  $\text{CCl}_4$ , (в)  $\text{H}_2\text{O}$  и (г) смесью  $\text{CCl}_4$  и воды (20:1 по объему растворитель:вода) в течение 1 часа [A4]

Взаимодействие аморфного порошка с парами воды в течение 1 ч приводит к образованию кристаллических структур, кривая (в) на Рисунке 47. Такой же

результат наблюдался для порошка, насыщенного с парами  $\text{CCl}_4$  в присутствии воды в течение 1 ч, кривая (г) на Рисунке 47. Во всех случаях GlyGly кристаллизовался в  $\alpha$ -форму [102]. Полученные результаты хорошо согласуются с данными АСМ, Рисунок 45–46 [А4].

Таким образом, данные ПРД подтверждают предположение о ключевой роли воды в формировании кристаллической структуры дипептида в твердом состоянии.

Было изучено влияние количества воды, добавляемой в систему, на самосборку GlyGly. Для этого аморфную пленку GlyGly насыщали парами воды, которые находились в равновесии с разным количеством жидкой воды: 5, 10, 25, 50 и 200 мкл. Следует отметить, что для образования насыщенных паров воды в используемой системе объемом 90 мл достаточно около 2.1 мкл жидкой воды. Однако, результаты, полученные для разных объемов жидкой воды, различаются, Рисунок 48.

Были получены АСМ изображения пленок GlyGly после насыщения парами воды при внесении в систему разного объема жидкости: 5 мкл (Рисунок 48а, б, в), 10 мкл (Рисунок 48г, д, е), 25 мкл (Рисунок 48ж, з, и), 50 мкл (Рисунок 48к, л, м), 200 мкл (Рисунок 48н, о, п) и разного времени насыщения: 10 минут (Рисунок 48а, г, ж, к, н), 60 минут (Рисунок 48б, д, з, л, о) и 24 часа (Рисунок 48в, е, и, м, п).

Насыщение пленки GlyGly парами воды после добавления в чашку Петри 5 мкл жидкости, приводит к формированию кристаллических структур, уже после 10 минут, Рисунок 48а.

Насыщение пленки парами воды после внесения 10 мкл жидкости приводит к формированию складчатой структуры, Рисунок 48г, д, е. На вершинах складок образуются зародыши диаметром от 400 до 650 нм. В результате увеличения объема добавляемой жидкости до 50 мкл, Рисунок 48к, л, м, также образуются кристаллические структуры. Однако, при насыщении в течение 24 часов, наблюдается растворение пленки, но сохраняются мелкие кристаллические частицы, Рисунок 48м. Увеличение количества добавляемой жидкой воды до 200 мкл и времени насыщения (24 ч) приводит к неожиданному результату, Рисунок

48п. На поверхности пленки обнаружены сферические частицы диаметром от 200 до 600 нм, при этом кристаллические структуры отсутствовали, Рисунок 48п.

Наблюдаемое влияние паров воды может быть связано с ограниченной растворимостью GlyGly в воде, капли которой могут образовываться на поверхности пленки в результате конденсации, Рисунок 35. Различие в растворимости аморфной и кристаллической фаз дипептида приводит к образованию пересыщенного раствора, из которого выпадают кристаллы и растворяются новые порции аморфной части. Увеличение количества воды, добавляемой в систему, ускоряет этот процесс. Однако, наличие большого избытка воды, достаточного для растворения практически всей пленки, приводит к образованию разбавленного раствора, из которого при относительно быстром испарении растворителя не образуются кристаллы. Образование сферических объектов может быть связано с молекулярной агрегацией и образованием коллоидного раствора при испарении воды.

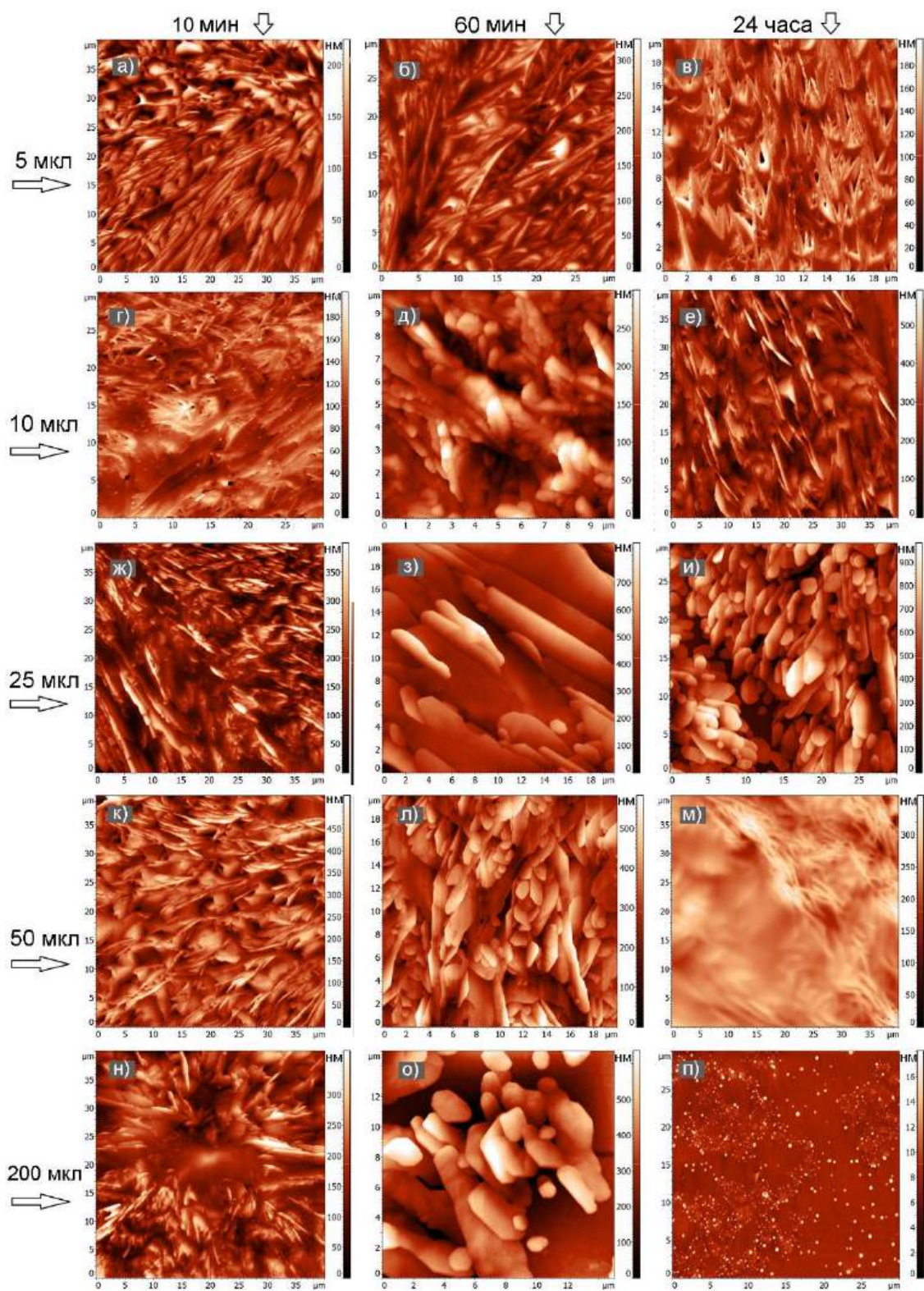


Рисунок 48 – АСМ изображение пленок GlyGly на кремниевой подложке, полученных из раствора метанол/вода после насыщения парами воды, при добавлении разного объема жидкости (а, б в) 5 мкл, (г, д, е) 10 мкл, (ж, з, и) 25 мкл, (к, л, м) 50 мкл, (н, о, п) 200 мкл, в течение (а, г, ж, к, н) 10 минут, (б, д, з, л, о) 60 минут и (в, е, и, м, п) 24 часов



Для изучения различных эффектов используемых органических паров на способность воды инициировать самосборку дипептида GlyGly было проведено дополнительное исследование для качественной оценки растворимости GlyGly. Для этого к 4 мг GlyGly добавляли 300 мкл растворителя, кроме дихлорметана. Через 24 ч полученные растворы использовали для приготовления пленок. Размер частиц, присутствующих на поверхности пленок, оценивали методом АСМ, Рисунок 49, Таблица 3 [А4].

При использовании дихлорметана в качестве растворителя растворимость GlyGly оказалась очень низкой. Даже при соотношении 1 мкг дипептида на 1 мл дихлорметана раствор представляет собой суспензию. Поэтому, оценить растворимость в этой системе не представлялось возможным [А4].

Таблица 3. Данные о размерах частиц GlyGly и расстоянии между ними по данным АСМ [А4].

Растворитель	Размер частиц, мкм	Средний размер частиц, мкм	Расстояние между частицами, мкм	Среднее расстояние между частицами, мкм	Масса частиц дипептида в растворе, мг
H <sub>2</sub> O	0.1- 0.3	0.2	0.5 - 1	0.8	~0.00006
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0.3 - 0.5	0.4	0.8 - 2	1.4	~0.00016
CHCl <sub>3</sub>	0.6 – 1.2	0.9	0.5 - 3	1.8	~0.00113
CCl <sub>4</sub>	0.8 – 1.3	1.1	1.5 - 3	2.3	~0.01125

Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении растворимости дипептида GlyGly в ряду вода>бензол>хлороформ>тетрахлорметан>дихлорметан,

так как размер частиц дипептида увеличивается в том же порядке, Рисунок 49, Таблица 3 [A4].

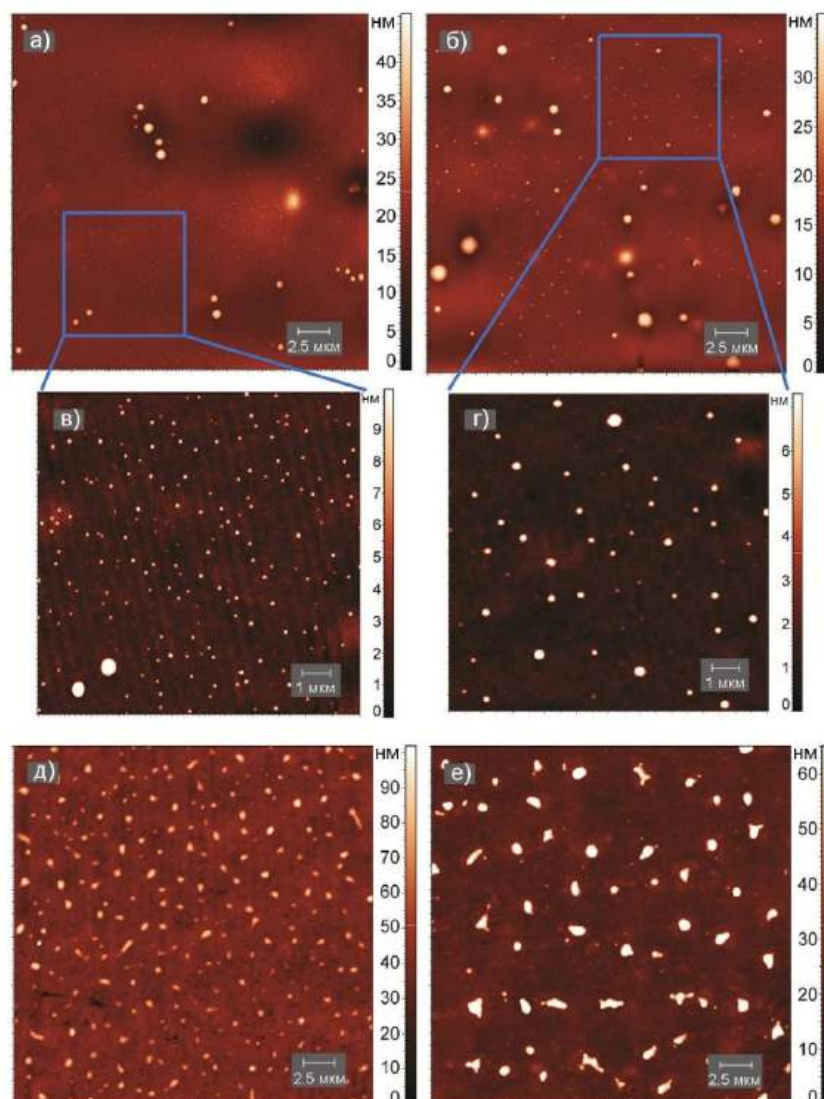


Рисунок 49 – АСМ изображения пленок GlyGly на кремниевой подложке, полученных из различных растворов: (а, в)  $\text{H}_2\text{O}$ , (б, г)  $\text{C}_6\text{H}_6$ , (д)  $\text{CHCl}_3$ , (е)  $\text{CCl}_4$  [A4]

Используя программное обеспечение для анализа данных АСМ, был рассчитан средний объем частиц на поверхности. Учитывая плотность кристаллов GlyGly, равную 1.5 г/мл, оценивали количество нерастворившегося дипептида в бензоле, тетрахлорметане или хлороформе, Таблица 3 [A4]. Таким образом, метод АСМ можно использовать для количественного определения растворимости органических веществ.

По данным АСМ было обнаружено, что нерастворившиеся частицы GlyGly располагаются на поверхности пленки на определенном расстоянии друг от друга, Рисунок 49, Таблица 3, что может быть связано с наличием поверхностного заряда у частиц дипептида, в результате чего они взаимно отталкиваются [А4].

Для оценки этого предположения раствор GlyGly в воде был исследован методом динамического рассеяния света (ДРС). По данным ДРС раствор (4 мг GlyGly на 300 мкл  $H_2O$ ) содержит частицы GlyGly со средним гидродинамическим диаметром 155 нм, Рисунок 50. Полученное значение хорошо согласуется с результатами АСМ, Рисунок 49 в, Таблица 3. Среднее значение  $\zeta$ -потенциала частиц составило -27.4 мВ. Таким образом, наблюдаемое относительное упорядоченное расположение частиц дипептида на поверхности подложки обусловлено наличием поверхностного заряда, Рисунок 49 [А4].

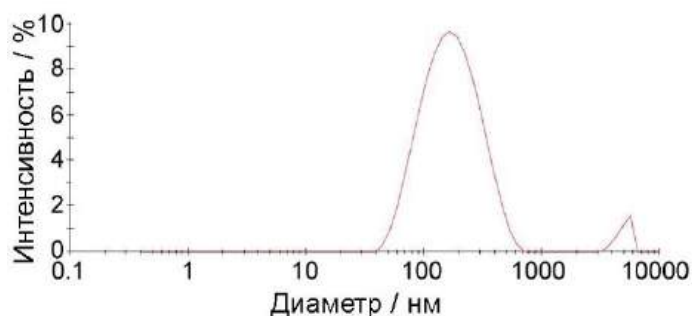


Рисунок 50 – Данные ДРС анализа раствора GlyGly в воде [А4]

### 3.3.2. Механизм влияния паров воды на самосборку глицил-глицина

Для установления механизма влияния паров воды на самосборку дипептида были использованы метод комбинационного рассеяния света (КРС) и квантово-химические расчеты. На Рисунке 51 представлены спектры КРС, зарегистрированные в диапазоне  $1700\text{--}800\text{ см}^{-1}$  для надосадочного раствора GlyGly в  $CCl_4$  (спектр а), аморфной пленки GlyGly (спектр б) и кристаллических структур, полученных после насыщения аморфной пленки GlyGly смесью  $CCl_4$  и паров воды (спектр в) в течении суток [А4].

Во всех спектрах присутствуют пики в области  $964 - 984 \text{ см}^{-1}$ , которые по данным [103] относятся к растяжению C–C связи вблизи концевой карбоксильной группы. В диапазоне  $1102 - 1186 \text{ см}^{-1}$  наблюдаются скручивающие колебания группы  $-\text{CH}_2-$  [103, 104]. В диапазоне  $1644 - 1658 \text{ см}^{-1}$  происходит комбинация растяжения  $>\text{C}=\text{O}$  и ножничными колебаниями  $-\text{NH}_2$  [103] или растяжения групп  $>\text{C}=\text{O}$  и ножничными колебаниями группы  $-\text{NH}_3^+$  [104].

В полученных спектрах КРС были обнаружены характеристические пики для молекулярной и цвиттер-ионной форм GlyGly. В спектрах, полученных для раствора GlyGly в  $\text{CCl}_4$ , наблюдается широкий пик при  $1268 \text{ см}^{-1}$ , Рисунок 51, спектр а. Этот пик соответствует угловому изгибу группы C–O–H [105] или колебанию группы –O–H [106]. Такой же пик присутствует в спектре, полученном для аморфной пленки, Рисунок 51, спектр б. Это означает, что в исследуемом растворе и в аморфной пленке преобладает молекулярная форма дипептида. Следует отметить, что широкий пик с максимумом при  $1544 \text{ см}^{-1}$ , Рисунок 51, спектр а, относится к колебанию растворителя  $\text{CCl}_4$ , Рисунок 52 [A4].

После насыщения аморфной пленки GlyGly парами смеси воды и тетрахлорметана в течение суток в спектре появились пики при  $1406 \text{ см}^{-1}$  и  $1562 \text{ см}^{-1}$ , которые соответствуют валентным колебаниям  $-\text{COO}^-$  [107], Рисунок 51, спектр в. Этот спектр также имеет пик при  $1658 \text{ см}^{-1}$ , который может быть связан с ножничными колебаниями группы  $-\text{NH}_3^+$  [104].

Таким образом, полученные данные рамановской спектроскопии свидетельствуют о том, что в растворе в  $\text{CCl}_4$  и в аморфной пленке GlyGly находится преимущественно в молекулярной форме, в то время как в кристаллах, сформированных после воздействия паров воды и органического растворителя, присутствует цвиттер-ионная форма дипептида.

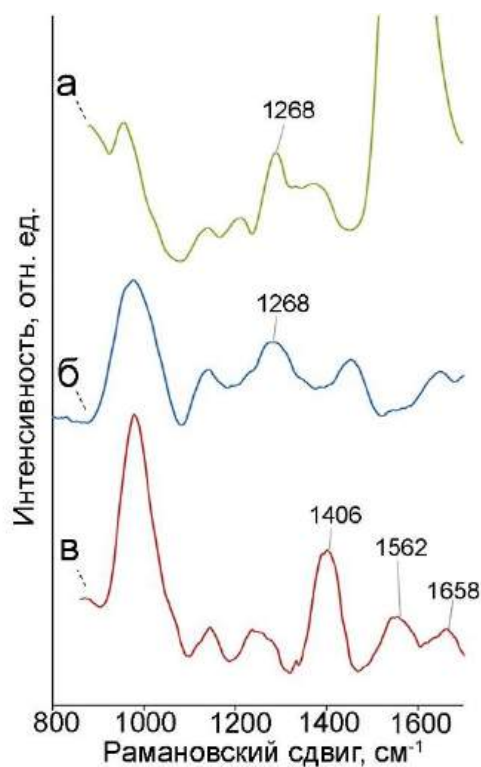


Рисунок 51 – Спектры комбинационного рассеяния света (а) раствора GlyGly в тетрахлорметане, (б) аморфной пленки GlyGly, (в) пленки после насыщения смесью паров воды и тетрахлорметана [A4]

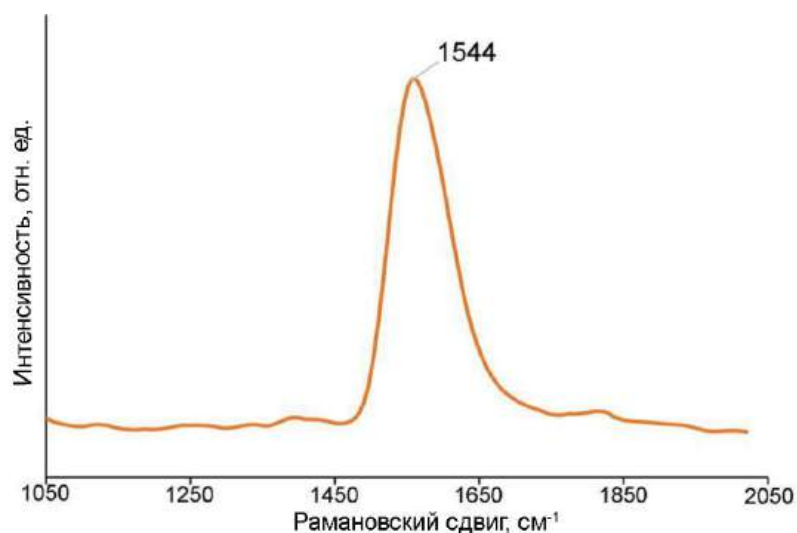


Рисунок 52 – Спектр комбинационного рассеяния света  $\text{CCl}_4$  [A4]

Для исследования возможного механизма влияния воды на самосборку GlyGly были проведены квантово-химические расчеты. Произведен поиск оптимальной геометрии одиночной молекулы GlyGly в молекулярной и цвиттер-

ионной формах в газовой фазе. Установлено, что молекулярная форма одиночной молекулы GlyGly хорошо локализована на поверхности потенциальной энергии, тогда как цвиттер-ионная форма может быть локализована только в окружении молекул растворителя. Наиболее устойчивым видом является кластер, состоящий из 1 молекулы GlyGly и 8 молекул воды с образованием до 8 водородных связей на 1 молекулу GlyGly, Рисунок 53 [A4].

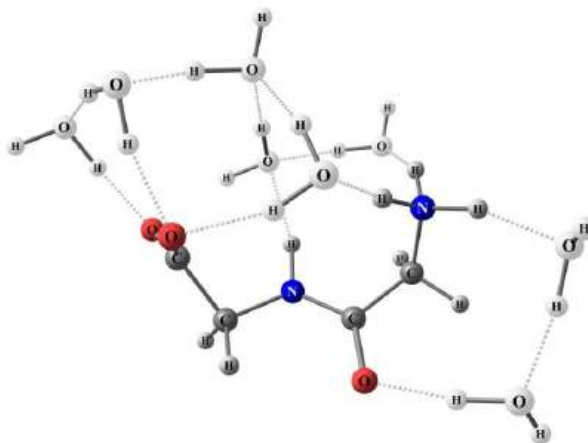


Рисунок 53 – Цвиттер-ионная форма GlyGly окружена 8 молекулами воды [A4]

Этот факт хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа монокристаллов [102]. Энергетический выигрыш цвиттер-ионной формы по сравнению с молекулярной формой GlyGly составляет  $-592.6 \text{ кДж моль}^{-1}$  [A4].

Таким образом, молекулярная форма дипептида GlyGly имеет более высокую энергию, чем цвиттер-ионная форма. Поэтому, достаточно небольшого внешнего воздействия для перехода от молекулярной формы GlyGly к цвиттер-ионной форме, которая в дальнейшем легко кристаллизуется [102].

В кристаллической фазе GlyGly находится в цвиттер-ионной форме [102], Рисунок 51 спектр в, а в аморфной пленке и в растворе GlyGly в тетрахлорметане дипептид находится в молекулярной форме, Рисунок 51 спектр а. Следовательно, для образования кристаллов необходим ионизирующий растворитель [A4].

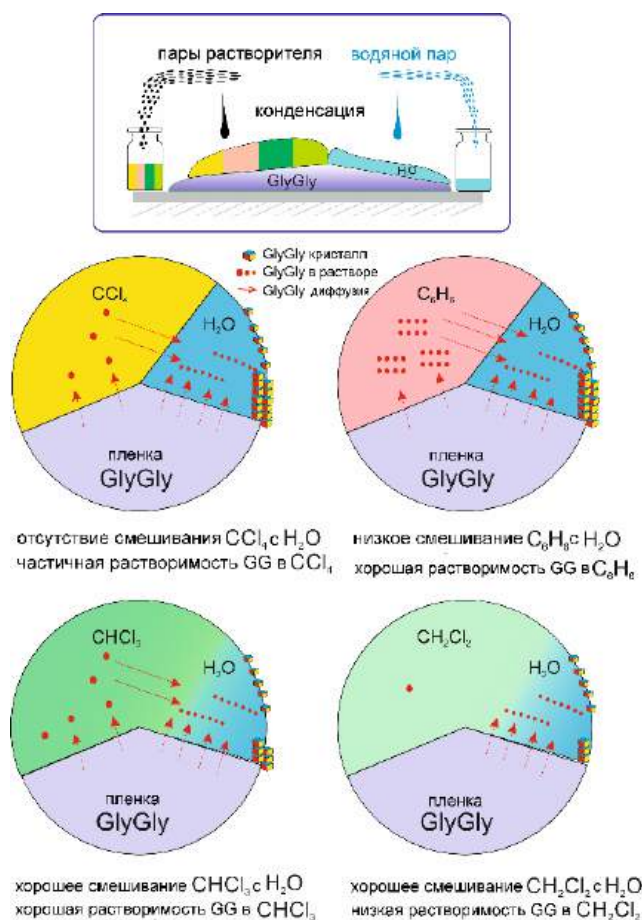


Рисунок 54 – Схема эксперимента и возможный механизм влияния воды на самосборку пленки GlyGly, насыщенной парами органических соединений [A4]

В настоящей главе показано, что таким растворителем является вода [A4]. Для объяснения различий процессов самосборки дипептидов в присутствии различных органических паров сравнивались полученные данные по растворимости GlyGly в органических средах с соответствующими коэффициентами активности при бесконечном разбавлении растворителей в воде:  $\gamma_\infty(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 185$ ,  $\gamma_\infty(\text{CHCl}_3) = 623$ ,  $\gamma_\infty(\text{C}_6\text{H}_6) = 2320$ ,  $\gamma_\infty(\text{CCl}_4) = 3450$  [108]. Гидрофобные тетрахлорметан и бензол не смешиваются с жидкой водой, Рисунок 54. Таким образом, после конденсации паров на поверхности пленки образуется двухфазная система «органический растворитель/вода». Обе фазы растворяют дипептид, но в органических средах GlyGly находится в молекулярной форме, а в водных средах молекулы дипептида находятся в цвиттер-ионной форме. При этом органическая фаза насыщается молекулами дипептида быстрее, чем вода, из-за меньшей растворимости GlyGly по данным АСМ. Молекулы дипептида диффундируют через границу раздела



«органический растворитель/вода» в направлении наилучшего растворителя, которым является вода. В системе с бензолом, который хорошо растворяет дипептид (лучше других используемых растворителей), диффузия молекул GlyGly больше, чем в случаях тетрахлорметана, хлороформа и дихлорметана. В результате, водная фаза быстро насыщается молекулами GlyGly и облегчается образование кристаллов дипептида, Рисунок 46к [A4].

Плохая растворимость дипептида в тетрахлорметане является причиной его меньшей диффузии GlyGly в водную фазу. Процесс кристаллизации замедляется, и через 10 мин на поверхности пленки обнаруживаются только не полностью сформировавшиеся кристаллы, Рисунок 46ж [A4]. Аналогичные структуры были обнаружены на поверхности пленки L-валил-L-аланина при кратковременном насыщении парами пиридина [91]. В случае хлороформа, который эффективно смешивается с водой по сравнению с используемыми гидрофобными соединениями, через границу «органический растворитель/вода» переносятся как молекулы дипептида, так и молекулы хлороформа. Поэтому, хлороформ конкурирует с дипептидом за образование раствора с водой. В результате снижается концентрация GlyGly в водно-органической фазе и наблюдается значительное замедление кристаллизации, Рисунок 46г, д, е. Аналогичная ситуация наблюдается и для системы дихлорметан/вода. Дихлорметан плохо растворяет дипептид, но лучше других исследованных растворителей смешивается с водой. Таким образом, для получения насыщенного раствора дипептида в смеси дихлорметана и воды требуется значительное время. Поэтому, кристаллизация дипептида в этом случае протекает наиболее медленно [A4].

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать несколько предположений [A4]:

- (1) Самосборка дипептида GlyGly инициируется парами воды, а не исследуемыми органическими соединениями.
- (2) Процессу кристаллизации предшествует образование раствора дипептида в конденсированных парах.

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

В данной работе впервые с помощью атомно-силовой микроскопии проведено исследование взаимного влияния паров воды и органических соединений на самосборку дипептида GlyGly в твердом состоянии. Состояние аморфной пленки GlyGly после насыщения парами органических веществ, таких как дихлорметан, хлороформ, тетрахлорметан и бензол, в отсутствие воды не меняется. Добавление паров воды в систему инициирует кристаллизацию дипептида. Действие воды зависит от свойств органического растворителя, используемого для взаимного насыщения водой дипептидной пленки. Органические соединения, хорошо растворяющие дипептид и плохо смешивающиеся с водой, ускоряют процесс кристаллизации дипептида. Результаты взаимодействия аморфной пленки дипептида с парами воды зависят также от общего количества воды, присутствующей в системе. Избыток воды в системе препятствует кристаллизации дипептида.

Предложен возможный механизм самосборки дипептида GlyGly в присутствии паров воды и органических соединений. Образование молекулярной формы GlyGly в аморфной пленке было доказано с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. Согласно квантово-химическим расчетам, молекулы воды инициируют переход молекул дипептида в цвиттер-ионную форму и стабилизируют ее. В результате общая энергия системы снижается. Пересыщение водного раствора молекулами дипептидов является причиной их самосборки в кристаллическую фазу. Показана возможность использования атомно-силовой микроскопии для качественной оценки растворимости дипептида в органических средах и воде.

Показано, что насыщение пленок аморфных дипептидов парами органических соединений является простым, эффективным, быстрым и дешевым методом выращивания кристаллов GlyGly.

### 3.4. Влияние порядка следования аминокислотных остатков в дипептидах L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин на формирование наноструктур.

#### 3.4.1. Самоорганизация и самосборка L-лейцил-L-фенилаланина

Были получены АСМ изображения пленок LeuPhe из раствора в HFIP с концентрацией 0.4 мг/мл, Рисунок 55. На поверхности кремния при самопроизвольном высыхании, Рисунок 55а, образуются иглообразные структуры длиной 2–13 мкм. При принудительной сушке, Рисунок 55б, формируются вытянутые протяженные кристаллы иглообразной формы длиной 1 - 7 мкм, шириной 300 нм - 1 мкм.

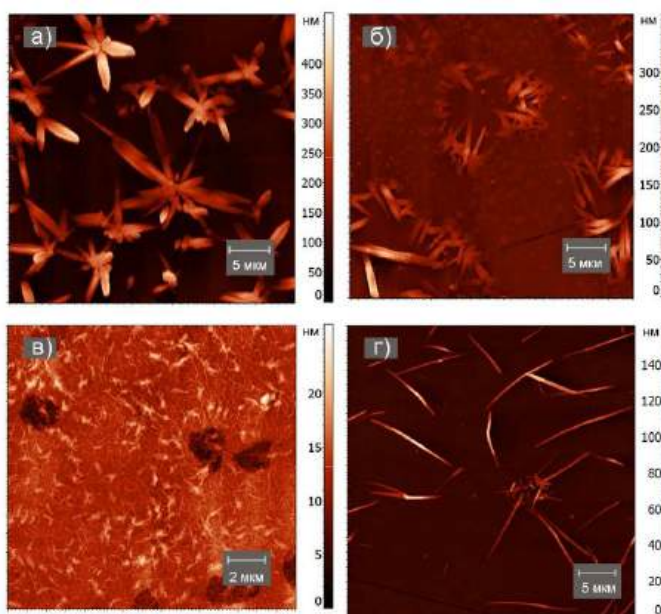


Рисунок 55 – АСМ изображения пленок LeuPhe из раствора в HFIP (0.4 мг/мл) на кремневой подложке, полученные методами самопроизвольной (а) и принудительной (б) сушки, методом вращающейся подложки (в), после насыщения парами MeOH (г)

Поскольку поверхность пленок была хорошо развита, было принято решение использовать дополнительный метод получения пленок: метод вращающейся подложки [108]. Нанесение раствора на вращающуюся подложку привело к

формированию плотно расположенных нитевидных нанобразований, Рисунок 55в. Среднеквадратичная шероховатость пленки на скане  $15 \times 15 \text{ мкм}^2$  –  $2.2 \pm 0.1 \text{ нм}$ .

После насыщения метанолом на подложке были обнаружены иглообразные структуры длиной 10–15 мкм, Рисунок 55г. В некоторых случаях длина не превышает 3 мкм. Толщина иглоек составляет 500–800 нм.

Для пленок дипептида LeuPhe, полученных из раствора в метаноле (концентрация 1 мг/мл) наблюдается формирование кристаллических структур [A5]. Самопроизвольное высыхание раствора, Рисунок 56а, приводит к формированию на поверхности кремния отдельных протяжённых волокон длиной более 10 мкм, шириной 1–3 мкм [A5]. После принудительной сушки на поверхности образуются большие дендритные структуры, длиной от 5 до 15 мкм, разброс по высоте составляет 1.5 мкм, Рисунок 56б. В центре дендритов присутствуют мелкие кристаллы, длиной около 1 мкм [A5].

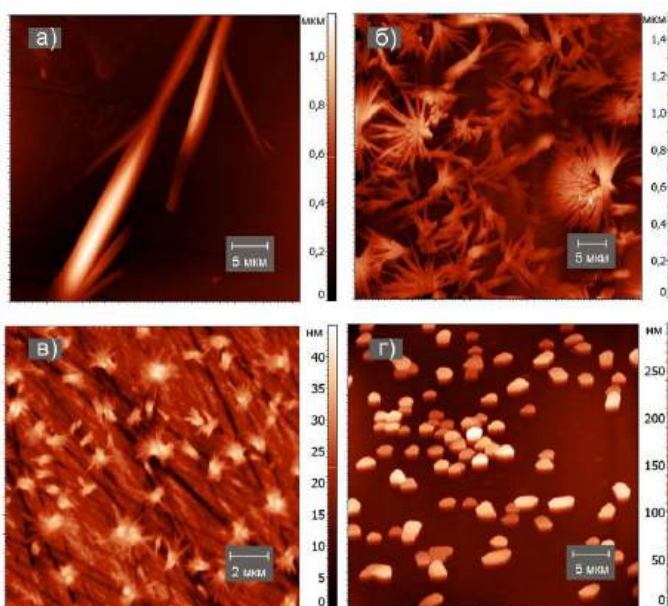


Рисунок 56 – АСМ изображения пенек LeuPhe из раствора в MeOH (1 мг/мл) на кремневой подложке, полученные методами самопроизвольной (а) и принудительной (б) сушки, методом вращающейся подложки (в), после насыщения парами метанола (г) [A5]

При использовании метода вращающейся подложки на поверхности пленки дипептида LeuPhe образуются мелкие шарообразные структуры с ворсинками, Рисунок 56в. Большая часть шаров имеют длину менее 1 мкм, некоторые же достигают 2 мкм, 56в. При насыщении пленки LeuPhe метанолом на поверхности образовались практически одинаковые крупные кристаллы высотой около 300 нм и шириной от 1 до 3 мкм, Рисунок 56г.

По данным рентгеноструктурного анализа [8] каждая молекула дипептида LeuPhe может образовывать до 9 водородных связей. В элементарной кристаллической ячейке дипептида LeuPhe присутствует 4 молекулы, Рисунок 57, сингония является моноклинной, размеры кристаллической решетки  $a \times b \times c = 16.824 \times 5.3659 \times 17.578$ . Поскольку в моноклинной сингонии боковые ребра элементарной кристаллической решетки являются прямоугольниками, то кристаллы LeuPhe представляют собой параллелепипеды. Данный факт хорошо согласуется с данными АСМ, полученными в настоящей работе. На поверхности пленки LeuPhe после насыщения парами метанола формируются прямые параллелепипеды, рост кристаллов происходит вверх относительно поверхности пленки.

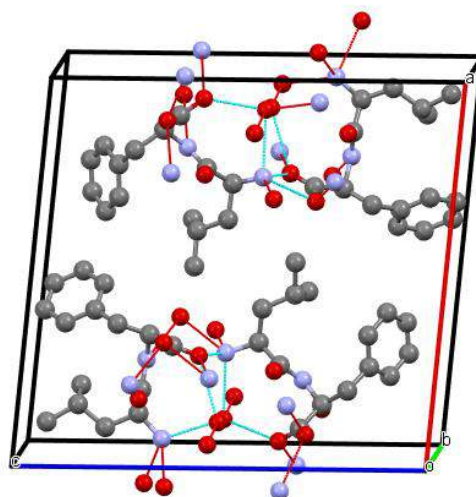


Рисунок 57 – Схематическое изображение элементарной кристаллической ячейки кристалла LeuPhe [8]

При насыщении пленки LeuPhe парами метанола было установлено, что размер формирующихся кристаллов зависит от времени насыщения, Рисунок 58.

Так, насыщение пленки парами в течение 10 минут, Рисунок 58а, приводит к образованию структур высотой до 60 нм. После 30 минут, Рисунок 58б, образуются структуры высотой до 100 нм.

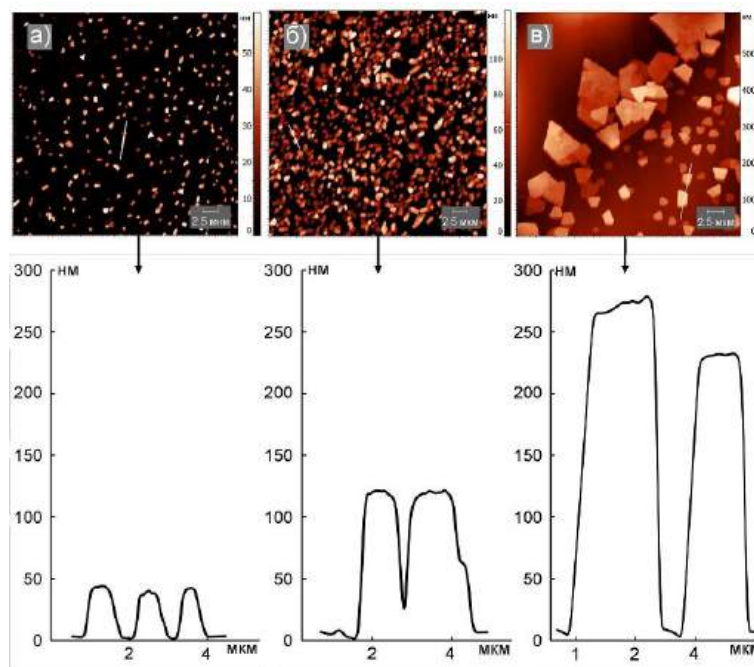


Рисунок 58 – АСМ изображения пенки LeuPhe из раствора в MeOH (1 мг/мл) на кремневой подложке, после насыщения парами MeOH в течении 10 мин (а), 30 мин (б), 60 мин (в)

Насыщение пленки LeuPhe парами метанола в течение 60 минут приводит к образованию структур, высотой до 300 нм, Рисунок 58в. Полученные результаты свидетельствуют, что предложенную в настоящей работе методику можно использовать для контроля размеров формирующихся кристаллических структур на основе дипептида LeuPhe.

Таким образом, при самопроизвольном и принудительном высыхании пленки LeuPhe на кремниевой пластине формируются достаточно хорошо ограниченные кристаллы. Чаще всего они реализуются в виде иглообразных стержней, исходящих из центра кристаллизации или объединенных в ленты. При использовании метода вращающейся подложки на поверхности подложки



успевают образоваться зародыши. Насыщение парами метанола пленки LeuPhe приводит к формированию кристаллов в виде прямых параллелепипедов.

### 3.4.2. Самоорганизация и самосборка *L*-фенилаланил-*L*-лейцина

Были получены АСМ изображения пленок PheLeu из раствора в HFIP с концентрацией 0.4 мг/мл, Рисунок 59. После удаления растворителя как принудительным, так и самопроизвольным способом на поверхности кремния наблюдается формирование волокнистых островковых структур [A5]. При самопроизвольном высыхании островки достигают длины 10 мкм, также на поверхности формируются кристаллики различной формы длиной от 0.5 мкм до 2.5 мкм, рис 59а. При принудительном высыхании формируются большие структуры длиной от 10 до 15 мкм и маленькие структуры длиной 500 нм и менее, Рисунок 59б. Среднеквадратичная шероховатость пленок для сканов  $20 \times 20$  мкм<sup>2</sup> и  $20 \times 20$  мкм<sup>2</sup> составляет  $36.4 \pm 1.3$  нм и  $60 \pm 5$  нм соответственно [A5].

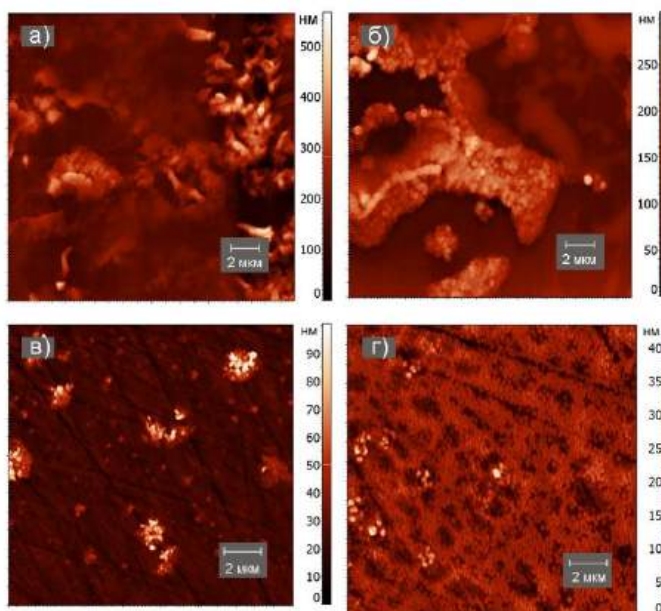


Рисунок 59 – АСМ изображения пленок PheLeu из раствора в HFIP (0.4 мг/мл) на кремневой подложке, полученные методами самопроизвольной (а) и принудительной (б) сушки, методом вращающейся подложки (в), после насыщения парами MeOH (г)



Методом вращающейся подложки на поверхности пленки дипептида PheLeu из раствора в HFIP сформировались структуры меньших размеров, Рисунок 59в. Более крупные кристаллы состоят из маленьких частиц длиной 200–500 нм. Также на поверхности пленки присутствуют зародыши схожего размера, которые в процессе испарения растворителя не успели собраться в большие структуры. Далее, полученную пленку насыщали парами метанола, Рисунок 59г. После взаимодействия пленки с парами  $\text{CH}_3\text{OH}$  на ее поверхности образовались круглые наноструктуры диаметром 100–250 нм, высота которых достигает 20 нм относительно пленки, Рисунок 59г. Частицы в островках, которые присутствовали на поверхности пленки до насыщения, стали более круглыми, диаметр составляет 300–500 нм.

На Рисунке 60 представлены АСМ изображения пленок PheLeu из раствора в  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

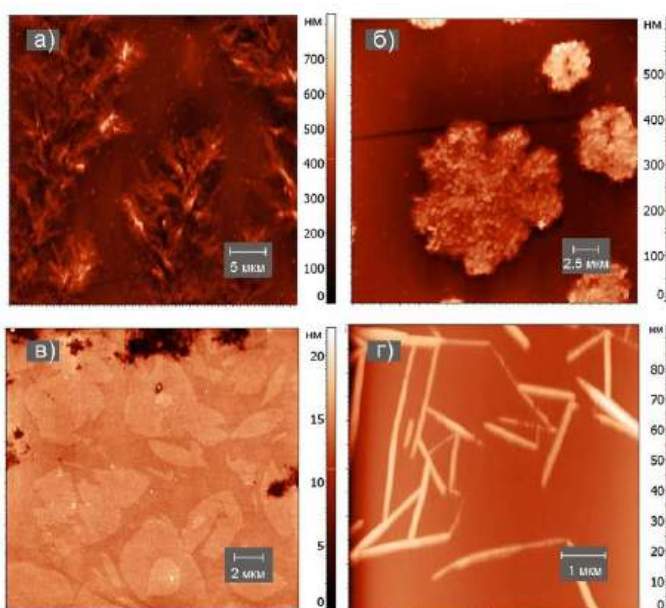


Рисунок 60 – АСМ изображения пленок PheLeu из раствора в MeOH (1 мг/мл) на кремневой подложке, полученные методами самопроизвольной (а) и принудительной (б) сушки, методом вращающейся подложки (в), после насыщения парами MeOH (г)

При самопроизвольном высыхании нанесенного на подложку раствора образуются протяженные дендритные структуры длиной от 10 до 40 мкм, Рисунок 60а. Ветви дендритов образуются на пути перемещения молекул дипептида по подложке к центру кристаллизации при испарении растворителя. Установлено, что после принудительного удаления растворителя, PheLeu на поверхности кремния формирует большие островковые структуры диаметром от 5 до 15 мкм, Рисунок 60б. При использовании метода вращающейся подложки на поверхности наблюдаются протяженные листообразные участки, площади которых заметно различаются, Рисунок 60в.

Установлено, что поверхность пленки дипептида PheLeu на скане  $20 \times 20$  мкм<sup>2</sup> имеет среднеквадратичную шероховатость  $1.2 \pm 0.1$  нм, 60в. После насыщения парами метанола в течение суток на поверхности пленки дипептида PheLeu сформировались вытянутые кристаллы длиной до 3 мкм, Рисунок 60г.

По данным рентгеноструктурного анализа [8] каждая молекула дипептида PheLeu может образовывать до 13 водородных связей. В элементарной кристаллической ячейке PheLeu находится 8 молекул дипептида, сингония является орторомбической, размеры кристаллической решетки  $a \times b \times c = 5.2103 \times 19.974 \times 30.919$ , Рисунок 61.

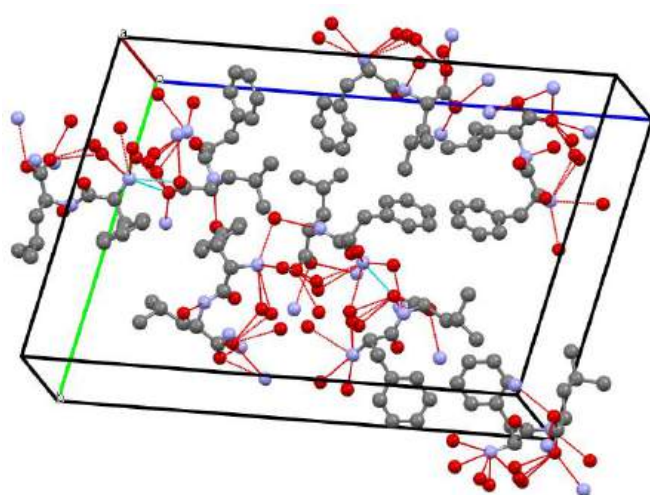


Рисунок 61 – Схематическое изображение элементарной кристаллической ячейки кристалла PheLeu [8]

По сравнению с моноклинной кристаллической ячейкой LeuPhe, кристаллическая ячейка PheLeu вытянута вдоль оси *c*. Поэтому наноструктуры на основе PheLeu преимущественно формируются в виде лент [8]. Данный факт хорошо согласуется с формой кристаллов PheLeu по данным АСМ, сформированным на поверхности пленки под действием паров метанола, Рисунок 60г.

В таблице 4 приведена систематизация типов наноструктур, формирующихся методом капельного испарения растворов дипептидов PheLeu и LeuPhe на поверхности кремниевых подложек.

Таблица 4. Основные виды наноструктур, сформированных на поверхности кремниевой пластины при различных методах получения

	Самопроизвольное высыхание	Принудительная сушка	Метод вращающейся подложки	Насыщение парами метанола
PheLeu	Островковые структуры	Дендритные или волокнистые структуры	Зародыши в виде нанокристаллов	Стержнеподобные структуры
LeuPhe	Иглообразные стержни или ленты	Иглообразные стержни или ленты	Зародыши в виде нанокристаллов	Плоские кристаллы и ленты

### 3.5. Пьезоэлектрические свойства структур на основе дипептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин

Среди всего разнообразия дипептидов хорошо изучены пьезоэлектрические свойства только дипептида PhePhe [74]. Было предположено, что наноструктуры на основе дипептидов PheLeu и LeuPhe также будут обладать пьезоэлектрическими свойствами.

С помощью силовой микроскопии пьезоотклика были проведены исследования кристаллических наноструктур на основе PheLeu и LeuPhe. На Рисунке 62 приведены АСМ изображения кристаллических структур PheLeu,

сформированных на кремниевой подложке после насыщения парами MeOH, зарегистрированных в режиме:

- топографии, Рисунок 62а,
- измерения амплитуды вертикальных, Рисунок 62б, и горизонтальных, Рисунок 62г, колебания кантилевера при измерении СМПО сигнала,
- измерения фазы вертикальных, Рисунок 62в, и горизонтальных, Рисунок 62д, колебания кантилевера при измерении СМПО сигнала.

Обнаружено, что наноструктуры PheLeu проявляют пьезоэлектрические свойства. Видно, что для большинства структур пьезосигнал присутствует как на изображениях, отвечающих за вертикальные колебания, Рисунок 62б, в, так и горизонтальные колебания, Рисунок 62г, д.

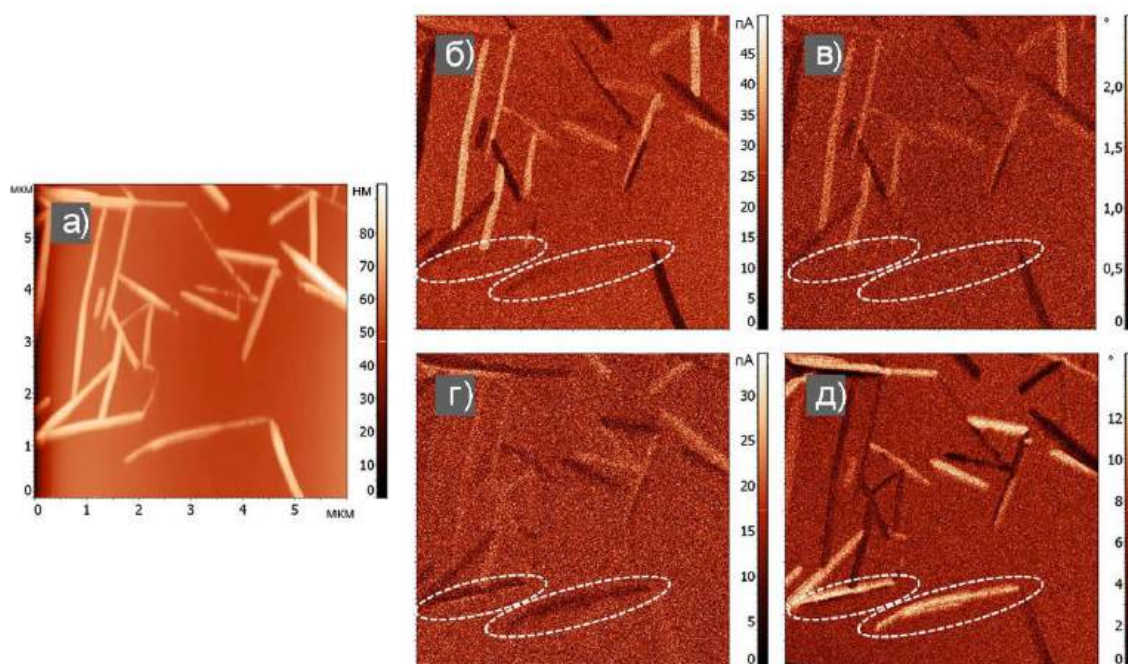


Рисунок 62 – СЗМ изображения кристаллических структур PheLeu, полученных на кремниевой подложке после насыщения парами MeOH: (а) топография, (б, г) амплитудные, (в, д) фазовые, изображения при вертикальных (б, в) и латеральных (г, д) измерениях

Причем, величина разброса СМПО сигнала на амплитудных изображениях примерно одинакова и составляет 50 пА для вертикальных колебаний, Рисунок 62б,

и 35 пА для горизонтальных колебаний, Рисунок 62г. Это означает, что вектор поляризации пьезоэлектрических доменов находится под углом к поверхности. Кроме того, на поверхности присутствуют структуры, пьезосигнал которых присутствует на изображениях, отвечающих за боковые (латеральные) колебания, рис 62г, д (выделено пунктирными овалами), и практически отсутствует на изображениях, которые отвечают за вертикальные колебания, Рисунок 62б, в. То есть поляризация этих структур направлена вдоль подложки.

Кристаллы LeuPhe, сформированные на поверхности пленки после насыщения парами метанола, также проявляют пьезоэлектрические свойства. На Рисунке 63 приведены АСМ изображения кристаллических структур LeuPhe, сформированных на кремниевой подложке после насыщения парами MeOH, зарегистрированных в режиме:

- топографии, Рисунок 63а,
- измерения амплитуды вертикальных, Рисунок 63б, и горизонтальных, Рисунок 63г, колебания кантилевера при измерении СМПО сигнала,
- измерения фазы вертикальных, Рисунок 63в, и горизонтальных, Рисунок 63д, колебания кантилевера при измерении СМПО сигнала.

Как видно из результатов СМПО, полученные структуры обладают пьезоэлектрическими свойствами. Следует отметить, что величина разброса СМПО сигнала на амплитудных изображениях сильно различается. Для вертикальных колебаний, Рисунок 63б, разброс составляет 450 пА, в то время как для горизонтальных колебаний, Рисунок 63г, эта величина более чем в 5 раз меньше и составляет 80 пА. Это свидетельствует о том, что векторы поляризации пьезоэлектрических доменов направлены преимущественно вертикально к поверхности, в отличие от векторов поляризации кристаллов PheLeu. Примечательно, что отдельные кристаллы, сросшиеся по ребру с соседними и образующие агломераты на поверхности, имеют противоположную поляризацию, Рисунок 63б.



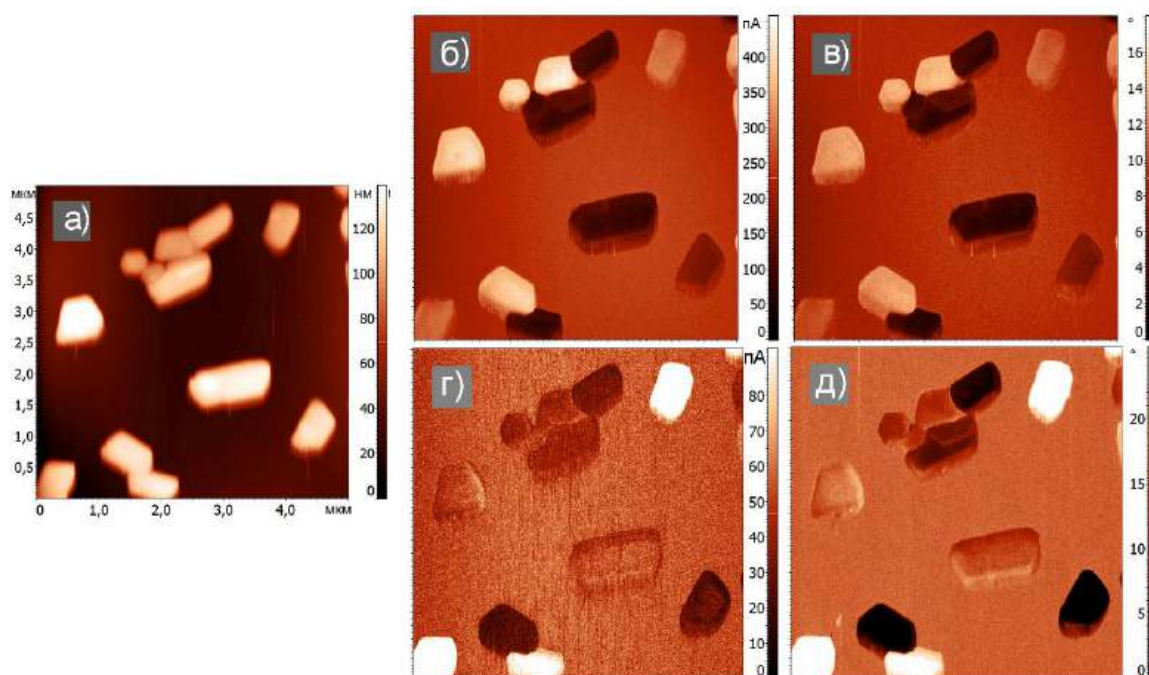


Рисунок 63 – Кристаллы LeuPhe, полученные на кремниевой подложке после насыщения парами MeOH: (а) топография, (б, г) амплитудные, (в, д) фазовые, изображения при вертикальных (б, в) и латеральных (г, д) измерениях

Таким образом, с помощью силовой микроскопии пьезоотклика впервые продемонстрированы пьезоэлектрические свойства структур на основе дипептидов PheLeu и LeuPhe. Векторы пьезоэлектрической поляризации доменов кристаллов на основе PheLeu, имеющих вытянутую вдоль поверхности пленки форму, расположены под углом к поверхности пленки. В то время как векторы поляризации доменов кристаллов LeuPhe преимущественно направлены перпендикулярно к поверхности пленки. Обнаруженные пьезоэлектрические свойства кристаллов на основе PheLeu и LeuPhe открывают перспективные пути их использования для разработки сенсорных устройств и для применения в биомедицинских областях. Например, наноструктуры на основе самособирающихся дипептидов могут использоваться в качестве пьезоэлектрических биосенсоров [110]. Основным преимуществом этих устройств является возможность относительно простой функционализации их поверхности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с поставленными задачами в результате исследования получены следующие результаты:

- установлено, что в результате воздействия паров сильного протонодонора этанола 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 аморфной пленки;

- 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;

- 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;

- 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;

- установлен механизм самосборки дипептида GlyGly в присутствии паров воды и органических соединений;

- показана возможность использования атомно-силовой микроскопии для качественной оценки растворимости дипептида в органических средах и воде;



- впервые продемонстрированы пьезоэлектрические свойства структур 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.

В работе представлено комплексное исследование самосборки короткоцепных олигопептидов и условия формирования микро- и наноструктурных объектов на их основе.

Благодаря своему химическому разнообразию и биосовместимости самособирающиеся олигопептиды могут дать ряд четко определенных наноструктур, которые представляют собой очень привлекательные наноматериалы для многих биомедицинских применений, таких как доставка лекарств и регенеративная медицина. Некоторые структуры на основе олигопептидов обладают оптическими и электрическими свойствами, тем самым преодолевая разрыв между биологическими системами и миром полупроводников. Важным является и поиск материалов, демонстрирующих сильное и надежное пьезоэлектричество в микро- и наномасштабе, так как предполагается, что такие структуры могут служить ключевыми элементами для будущих биосенсоров, обеспечивающих прямой контакт с тканями человека. Полученные в данной работе результаты открывают широкие возможности для разработки новых поколений «зеленых» пьезоэлектрических материалов и пьезонаноустройств на основе олигопептидных наноструктур, потенциально совместимых с тканями человека.

## СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АСС – атомно-силовая спектроскопия

ВОПГ – высокоориентированный пиролитический графит

ДРС - Динамическое рассеяние света

КРС - Комбинационное рассеяние света

ПРД - Порошковая рентгеновская дифрактометрия

СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия

СМПО – силовая микроскопия пьезоотклика

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

GlyGly – дипептид глицил-глицин

GlyGlyGly – трипептид глицил-глицил-глицин

ВОС - *трет*-бутилдикарбонат

AlaVal – дипептид <sub>L</sub>-аланил-<sub>L</sub>-валин

ValAla – дипептид <sub>L</sub>-валил-<sub>L</sub>-аланин

LeuLeu – дипептид <sub>L</sub>-лейцил-<sub>L</sub>-лейцин

LeuLeuLeu – трипептид <sub>L</sub>-лейцил-<sub>L</sub>-лейцил-<sub>L</sub>-лейцин

PheLeu - дипептид <sub>L</sub>-фенилаланил- <sub>L</sub>-лейцин

LeuPhe - дипептид <sub>L</sub>-лейцил- <sub>L</sub>-фенилаланин

Cyclo(Leu-Leu) – цикло(лейцил-лейцил)

PhePhe - дипептид дифенилаланин, <sub>L</sub>-фенилаланил- <sub>L</sub>-фенилаланин

PhePhePhe – трипептид <sub>L</sub>-фенилаланил-<sub>L</sub>-фенилаланил-<sub>L</sub>-фенилаланин

$R_q$  - Среднее квадратичное отклонение

## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю соавторов статей:

Зиганшина М.А., Кудрявцеву Е.О., Савостину Л.И., Герасимова А.В. (КФУ), Курбатову Н.В. (КФТИ).

Сотрудников лаборатории ФХП КФТИ Нургазизова Н.И., Чукланова А.П., Бизяева Д.А. за помощь в проведении экспериментов и моральную поддержку; Зиганшину С.А. за консультации в области химии и физико-химии олигопептидов.

Сотрудников лаборатории термоанализа материалов и материаловедения кафедры физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КФУ за помощь в проведении экспериментов.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

**Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:**

*Публикации в российских и зарубежных журналах:*

**A1.** Morozova, A.S. Additive and antagonistic effects of substrate and vapors on self-assembly of glycyl-glycine in thin films / A. S. Morozova, M.A. Ziganshin, S.A. Ziganshina, V.V. Vorobev, K. Suwinska, A.A. Bukharaev, V.V. Gorbachuk, // *Molecular Crystals And Liquid Crystals*. – 2019. – V. 690. – No. 1. – P. 67 – 83. DOI: 10.1080/15421406.2019.1683311.

**A2.** Morozova A. S. Features of the Self-organization of Films Based on Triglycine under the Influence of Vapors of Organic Compounds / A. S. Morozova, S. A. Ziganshina, A. A. Bukharaev, M. A. Ziganshin, and A. V. Gerasimov // *Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2020 – Vol. 14. – No. 3. – P. 499 – 506. DOI: 10.1134/S102745102003009X.

Морозова, А.С. Особенности самоорганизации пленок на основе триглицина под действием паров органических соединений / А.С. Морозова, С.А. Зиганшина, А.А. Бухараев, М.А. Зиганшин, А.В. Герасимов // *Поверхность*, 2020, 5, 73-81.

**A3.** Morozova, A.S. Self-organization of di- and triglycine oligopeptides in thin films on the hydrophilic and hydrophobic silicon surface under exposure to organic compounds vapors / A.S. Morozova, S.A. Ziganshina, M.A. Ziganshin, A.A. Bukharaev // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2022. – Vol. 92. – No. 7. – P. 1271-1279. DOI: 10.1134/S1070363222070155.

Морозова, А.С. Самосборка олигопептидов ди- и триглицина в тонких пленках на поверхности гидрофильного и гидрофобного кремния под действием паров органических соединений. / А. С. Морозова, С. А. Зиганшина, М. А. Зиганшин, А. А. Бухараев // *Журнал общей химии*. – 2022. – Т. 92, № 7, С. 1109–1118. DOI: 10.31857/S0044460X22070150.

**A4.** Morozova, A.S. Water admixture triggers the self-assembly of the glycyl-glycine thin film at the presence of organic vapors / A.S. Morozova, S.A. Ziganshina, E.O. Kudryavtseva, N.V. Kurbatova, L.I. Savostina, A.A. Bukharaev, M.A. Ziganshin //

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2022. – Vol. 649. – P.129541. – DOI: 10.1016/j.colsurfa.2022.129541.

**A5.** Морозова, А.С. Самосборка дипептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин по данным атомно-силовой микроскопии. / А.С. Морозова, С.А. Зиганшина, Е.О. Кудрявцева, А.А. Бухараев // Казанский физико-технический институт имени Е.К Завойского. Ежегодник. – 2022. – Т. 2021, С. 36-39.

*Сборники трудов конференций:*

**A6.** Морозова А. С., Зиганшина С. А., Кудрявцева Е. О., Бухараев А. А., Зиганшин М. А. Самосборка короткоцепных олигопептидов с образованием микро и нано объектов и их свойства по данным СЗМ. // Труды XXVII Международного симпозиума «Нанозифика и нанозлектроника» 13 – 16 марта 2023 г. Нижний Новгород, Том 1, стр. 469-470.

**A7.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Кудрявцева Е.О., Курбатова Н.В., Савостина Л.И., Бухараев А. А., Зиганшин М. А. Самосборка тонкой пленки глицил-глицина в присутствии органических паров. // XXIX Российская конференция по электронной микроскопии «Современные методы электронной, зондовой микроскопии и комплементарных методов исследования наноструктур и наноматериалов». г. Москва, 29-3 августа 2022 г. Сборник тезисов. С. 570-571.

**A8.** Кудрявцева Е.О., Морозова А.С., Зиганшина С.А., Зиганшин М. А., Бухараев А. А. Самосборка дипептидов L-фенилаланил-L-лейцин и L-лейцил-L-фенилаланин по данным атомно-силовой микроскопии // XXIX Российская конференция по электронной микроскопии «Современные методы электронной, зондовой микроскопии и комплементарных методов исследования наноструктур и наноматериалов». г. Москва, 29-3 августа 2022 г. Сборник тезисов. С. 552-553.

**A9.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Кудрявцева Е.О., Бухараев А. А., Зиганшин М. А. Главный фактор образования наноструктур в тонких органических пленках на основе дипептида глицил-глицин // Сборник тезисов IV семинара «Современные нанотехнологии» (IWMN-2022) (Екатеринбург, 24-27 августа 2022 г.) Екатеринбург, Уральский федеральный университет, 2022. С. 177.

**A10.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Зиганшин М. А., Бухараев А. А. Самосборка олигопептидов ди- и триглицин в тонких пленках на поверхности гидрофильного и гидрофобного кремния // Сборник тезисов IV семинара «Современные нанотехнологии» (IWMN-2022) (Екатеринбург, 24-27 августа 2022 г.) Екатеринбург, Уральский федеральный университет, 2022. С. 172.

**A11.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Кудрявцева Е.О., Бухараев А. А., Зиганшин М. А. Вода как главный фактор образования микро- и наноструктур в тонких органических пленках // Труды XXVI Международного симпозиума «Нанозифика и нанозлектроника» 14 – 17 марта 2022 г. Нижний Новгород, Том 1, стр. 469-470.

**A12.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Зиганшин М.А., Бухараев А.А. Влияние степени гидрофобности подложек на формирование кристаллических нано-структур на основе трипептида глицина // Труды XXVI Международного симпозиума «Нанозифика и нанозлектроника» 14 – 17 марта 2022 г. Нижний Новгород Том 1., стр. 316-317.

**A13.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Зиганшин М.А., Бухараев А.А. Наноразмерные структуры на основе триглицина, сформированные из тонкой пленки на кремниевых подложках под действием органических соединений // Объединенная конференция «Электронно-лучевые технологии и рентгеновская оптика в микрозлектронике» КЭЛТ – 2021. Тезисы докладов – М., ООО «ФУТУРИС ПРИНТ», 13 - 17 сентября 2021г., 364 с.

**A14.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Бухараев А.А., Зиганшин М.А. Наноразмерные структуры на основе диглицина по данным сканирующей зондовой микроскопии // Труды XXV Международного симпозиума «Нанозифика и нанозлектроника» 9 – 12 марта 2021 г. Нижний Новгород, Том 1., стр. 316-317.

**A15.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Бухараев А.А., Зиганшин М.А. Самоорганизация ди- и трипептида на основе глицина под действием паров органических соединений по данным атомно-силовой микроскопии // XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии VI школа молодых учёных «Современные методы электронной, зондовой микроскопии и комплементарных

методов исследования наноструктур и наноматериалов». г. Черноголовка, 5 – 6 сентября 2020г. Том 1. 87 с. DOI: 10.37795/RCEM.2020.17.23.035.

**A16.** Зиганшина С.А., Морозова А.С., Зиганшин М.А., Бухараев А.А. Влияние подложки на самосборку глицил-глицина в тонких пленках под действием паров органических соединений // Труды XXIV Международного симпозиума «Нанопизика и нанопэлектроника» 10 – 13 марта 2020 г. Нижний Новгород, Том 1., стр. 364-365.

**A17.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Зиганшин М.А., Бухараев А.А. Формирование наноразмерных структур на основе триглицина под действием органических соединений на различных кремниевых подложках // Труды XXIV Международного симпозиума «Нанопизика и нанопэлектроника» 10 – 13 марта 2020 г. Нижний Новгород, Том 1, стр. 380-381.

**A18.** Morozova A.S., Ziganshina S.A., Bukharaev A.A., Ziganshin M.A. Effect of the hydrophilicity degree of silicon substrate on the morphology of the triglycine film // Scanning Probe Microscopy. Russia-China Workshop on Dielectric and Ferroelectric Materials. Abstract Book of Joint International Conference (Ekaterinburg, August 25-28, 2019) Ekaterinburg, Ural Federal University, 2019- 301 с.

**A19.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Бухараев А.А., Зиганшин М.А. Влияние количества аминокислотных остатков в олигопептидах на основе глицина на их самоорганизацию в пленках // Труды XXIII Международного симпозиума «Нанопизика и нанопэлектроника» 11 – 14 марта 2019 г. Нижний Новгород, Том 1., стр. 373-374.

**A20.** Morozova A.S., Ziganshina S.A., Bukharaev A.A., Ziganshin M.A. 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-. Abstract Book of International Conference (Ekaterinburg, August 28-30, 2017) Ekaterinburg, Ural Federal University, 2017. С. 188 - 189.

**A21.** Морозова А.С., Зиганшина С.А., Бухараев А.А., Зиганшин М.А. Исследование методами атомно-силовой микроскопии процессов самоорганизации в пленках дипептида при воздействии парообразных органических соединений //



Когерентная оптика и оптическая спектроскопия: XX Международная научная школа: сб. статей (18-20 октября 2016 г.) / Под ред. М.Х. Салахова. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2016. – 168 с.

**A22.** Морозова, А.С. Морфология пленок дипептида глицил-глицин до и после взаимодействия с парами органических веществ / А.С. Морозова, С.А. Зиганшина, А.А. Бухараев, М.А. Зиганшин // Сборник Тезисов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань.: КФУ, 2016. С. 280.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак; пер. Н. В. Баскакова. – Москва: Мир, 2002. – 589 с.
2. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the «Gold Book»). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.P04898.
3. Multiscale simulations for understanding of evolution and mechanism of hierarchical peptide self-assembly / C. Yuan [et al.] Phys. Chem. Chem. Phys. – 2017. – No 19. – P. 23624-23631. – DOI: 10.1039/C7CP01923H.
4. Goldfarb, A.R. The ultraviolet absorption spectra of proteins / A.R. Goldfarb, L.J. Sidel, E. Mosovich // Biol Chem. – 1951. – Vol. 193. – P.397-404. – DOI:10.1016/S0021-9258(19)52465-6
5. Kim, S. Beta-Sheet-Forming, Self-Assembled Peptide Nanomaterials towards Optical, Energy, and Healthcare Applications / S. Kim, J.H. Kim, J.S. Lee, C.B. Park // Small. – 2015. – Vol. 11. – P. 3623-3640. DOI: 10.1002/sml.201500169.
6. Kim, J.Y. Effect of microsolvating water on the stability of zwitterionic vs. canonical diglycine / J.Y. Kim, G.Y. Won, S. Lee // Bull Korean Chem. Soc. – 2014. – Vol. 35. – P.798-804. – DOI:10.5012/bkcs.2014.35.3.798.
7. Koyambo-Konzap, S.J. Solvent effects on the structures and vibrational features of zwitterionic dipeptides: L-diglycine and L-dialanine / S.J. Koyambo-Konzap, A. Minguirbara, M. Nsangou // J. Mol. Model. – 2015. – Vol. 21. – P.1-12. – DOI: 10.1007/s00894-015-2718-x.
8. Gorbitz, C.H. Nanotube Formation by Hydrophobic Dipeptides / Gorbitz C.H. // Chem. Eur. J. – 2001. – Vol. 7, N.23. – P.5153-5159. – DOI: 10.1002/1521-3765(20011203)7:23<5153::AID-CHEM5153>3.0.CO;2-N.
9. Травень, В.Ф. Органическая химия: Учебник для вузов: В 2 т. / В. Ф. Травень. – Москва.: ИКЦ «Академкнига», 2004. – 727 с.

10. Interaction of L-alanyl-L-valine and L-valyl-L-alanine with organic vapors: thermal stability of clathrates, sorption capacity and the change in the morphology of dipeptide films / M.A. Ziganshin [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2015. – Vol. 17. – P.20168-20177. – DOI: 10.1039/C5CP03309H.
11. Reches, M. Formation of Closed-Cage Nanostructures by Self-Assembly of Aromatic Dipeptides / M. Reches and E. Gazit // *Nano Lett.* – 2004. – Vol. 4. – P.581-585. – DOI: 10.1021/nl035159z.
12. Gazit, E. Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization / E. Gazit // *Chem. Soc. Rev.* – 2007. – Vol. 36. – P. 1263-1269. – DOI: 10.1039/b605536m.
13. Dutta, A., Supramolecular helix and  $\beta$ -sheet through self-assembly of two isomeric tetrapeptides in crystals and formation of filaments and ribbons in the solid state / A. Dutta, A. Dutt, M.G.B. Drew, A. Pramanik // *Supramolecular Chemistry*. – 2008. – Vol. 20. – P. 625-633. – DOI: 10.1080/10620270701565194.
14. Habibi, N. Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery / N. Habibi, A. Memic, N. Kamaly, H. Shafiee // *Nano Today*. – 2016. – Vol. 11. – P. 20. – DOI: 10.1016/j.nantod.2016.02.004.
15. Beesley, J. L. The de novo design of  $\alpha$ -helical peptides for supramolecular self-assembly / J. L. Beesley, D. N. Woolfson // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 58. – P. 175-182. – DOI: 10.1016/j.copbio.2019.03.017.
16. Spontaneous Alignment of Self-Assembled Cationic and Amphiphilic  $\beta$ -Sheet Peptides / G. Yosefi [et al.] // *Advanced Materials Interfaces*. – 2020. – Vol. 7. – P. 2000332-1-2000332-8. – DOI: 10.1002/admi.202000332.
17. Ordered Nanofibers Fabricated from Hierarchical Self-Assembling Processes of Designed  $\alpha$ -Helical Peptides / J. Li [et al.] // *Small*. – 2020. – Vol. 16. – P. 2003945-1-2003945-11. – DOI: 10.1002/smll.202003945.
18. Франк, Л. А. Биоорганическая химия: учебное пособие / Л. А. Франк. – Красноярск: СФУ, 2018. – 174 с.

19. Engineering Increased Stability into Self-Assembled Protein Fibers / A.M. Smith, E.F. [et al.]. // *Adv. Funct. Mater.* – 2006. – Vol. 16. – P. 1022 - 1030. – DOI: 10.1002/adfm.200500568.
20. Structure and Assembly of Designed  $\beta$ -Hairpin Peptides in Crystals as Models for  $\beta$ -Sheet Aggregation / S. Aravinda [et al.] // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43. – P. 1832-1846. – DOI: 10.1021/bi035522g.
21. Kazuto, F. Self-Assembling Peptides as Building Blocks of Functional Materials for Biomedical Applications / F. Kazuto, T. Hiroshi, M. Hisakazu // *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* – 2019. – Vol. 92. – P. 391-399. – DOI: 10.1246/bcsj.20180293.
22. A method for top down preparation of chitosan nanoparticles and nanofibers / R. N. Wijesena [et al.] // *Carbohydrate Polymers.* – 2014. – Vol. 117. – P. 731-731. – DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.055.
23. Ghazali, N.A.B. Top-down fabrication optimisation of ZnO nanowire-FET by sidewall smoothing / N.A.B. Ghazali, N. M. J. Ditshego, M.de Planque, M. Ebert // *Microelectronic Engineering* – 2016. – Vol. 159. – P. 121-126. – DOI: 10.1016/j.mee.2016.02.068.
24. Lehn, J.-M. Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization / J.M. Lehn // *PNAS* – Vol. 99. – 8 – P. 4763-4768. – DOI: 10.1073/pnas.072065599.
25. Zhang, Sh. Building from the bottom up / Sh. Zhang // *Nanotoday.* – 2003. – Vol. 6. – P. 20-27. – DOI: 10.1016/S1369-7021(03)00530-3.
26. Terminology for aggregation and self-assembly in polymer science (IUPAC Recommendations 2013) / R.G. Jones [et al.] // *Pure Appl. Chem.* – 2013. – Vol. 85. – P. 463-492. – DOI: 10.1351/PAC-REC-12-03-12.
27. Зиганшин М.А. Самосборка, сорбционные и термические свойства синтетических и природных супрамолекулярных рецепторов: дис. ... д-ра х. наук : 02.00.04 / Зиганшин Марат Ахмедович. – К., 2019. – 315 с.
28. Whitesides, G. M. Self-assembly at all scales / G. M. Whitesides, B. Grzybowski // *Science.* – 2002. – Vol. 295. – P. 2418-2421. – DOI: 10.1126/science.1070821.

29. Halley, J.D. Consistent concepts of self-organization and self-assembly / J.D. Halley, D.A. Winkler // Complexity. – 2008. – Vol. 14. – P. 10-17. – DOI: 10.1002/cplx.20235.
30. Tao, K. Self-assembling peptide semiconductors / K. Tao, P. Makam, R. Aizen, E. Gazit // Science. – 2017. – Vol. 358. – P. 1-7. – DOI:10.1126/science.aam9756.
31. Langmuir-Blodgett films / J. Zasadzinski [et al.] // Science. – 1994. – Vol. 263. – P.1726-1733. –DOI:10.1126/science.8134836.
32. Yuran, S. Coassembly of Aromatic Dipeptides into Biomolecular Necklaces / S. Yuran, Y. Razvag, M. Reches // Acs Nano. – 2016. – Vol.6. –P. 9559-9566. – DOI:10.1021/nn302983e.
33. Effect of Solvent on the Self-Assembly of Dialanine and Diphenylalanine Peptides / A. N. Rissanou [et al.] // The Journal of Physical Chemistry B. – 2013. – Vol. 117. – P. 3962-3975. – DOI: 10.1021/jp311795b.
34. Self-Assembly of Phenylalanine Oligopeptides: Insights from Experiments and Simulations. Biophysical Journal / Ph. Tamamis, [et al.] // Biophysical journal. – 2009. . – Vol. 96. – P. 5020-5029. – DOI: 10.1016/j.bpj.2009.03.026.
35. Acuña, S. M. Self-Assembly of Diphenylalanine-Based Nanostructures in Water and Electrolyte Solutions / S. M. Acuña, M. C. Veloso, P. G. Toledo // Journal of Nanomaterials. – 2018. – Vol. – P. 1-7. – DOI: 10.1155/2018/8140954.
36. Solvent and surface controlled self-assembly of diphenylalaninepeptide: from microtubes to nanofibers / R. Huang [et al.]// Soft Matter. – 2011. – Vol. 7. – P. 6418-6421. – DOI:10.1039/c1sm05752a.
37. Evans, P.G. Handbook of crystal growth. / P.G. Evans, J.W. Spalenka. –Second Edition, 2015. – P. 509-554. – DOI: 10.1016/C2013-0-09791-5.
38. Ryu, J. High-Temperature Self-Assembly of Peptides into Vertically Well-Aligned Nanowires by Aniline Vapor / J. Ryu, Ch.B. Park // Adv. Mater. – 2008. – Vol. 20. – P. 3754-3758. – DOI: 10.1002/adma.200800364.
39. Lee, J. S. Bio-inspired fabrication of superhydrophobic surfaces through peptide self-assembly / J. S. Lee, J. Ryu, C. B. Park // Soft Matter. – 2009. – Vol. 5. – P. 2717-2720. – DOI:10.1039/b906783c.

40. El-Eskandarany, M. S. Mechanical Alloying: Energy Storage, Protective Coatings, and Medical Applications / M. S. El-Eskandarany. – William Andrew, 2020. P. 484. – DOI:10.1016/b978-0-12-818180-5.00001-7.
41. Thermal Stability, Sorption Properties and Morphology of Films of Dipeptide and Tripeptide Based on L-Glycine. / M. Ziganshin [et al.]// J. Chem . – 2015. – Vol. 31. – P. 1977-1984. – DOI: 10.13005/ojc/310415.
42. de Oliveira, R. F. Nanostructured Films: Langmuir–Blodgett (LB) and Layer-by-Layer (LbL) Techniques / R. F. de Oliveira, A. de Barros, M. Ferreira // Nanostructures. – 2017. – pp.105-123. – DOI: 10.1016/b978-0-323-49782-4.00004-8.
43. Velázquez, M. M., Langmuir-Blodgett Methodology: A Versatile Technique to Build 2D Material Films. Two-Dimensional Materials - Synthesis, Characterization and Potential Applications. / M. M. Velázquez, T.Alejo, D.López-Díaz, B.Martín-García, M. D. Merchán. – Pramoda Kumar Nayak, 2016. – pp.21-42. – DOI: 10.5772/63495.
44. Piezoactive dense diphenylalanine thin films via solid-phase crystallization / K. Romanyuk [et al.]// Applied Materials Today. – 2022. – Vol. 26. – DOI: 10.1016/j.apmt.2021.101262.
45. Brooks, J.S. Organic crystals: properties, devices, functionalization and bridges to bio-molecules / J.S. Brooks // Chem. Soc. Rev. – 2010. – Vol. 39. – P. 2667-2694. – DOI:10.1039/B913417B.
46. Влияние подложки на морфологию пленок дипептида l-валил-l-аланин до и после взаимодействия с парами пиридина / М. А. Зиганшин [ и др.] // Физикохимия поверхности и защита материалов. – 2013. – Том 49. - № 3. - С. 1–6. – DOI: 10.7868/S0044185623030170.
47. The influence of the localised charge of C- and N-termini on peptide self-assembly / C. Bortolini [et al.] // Soft Matter. –2016. – Vol. 12. –P. 373–377. – DOI: 10.1039/C5SM01669J.
48. Solvent-Induced Structural Transition of Self-Assembled Dipeptide: From Organogels to Microcrystals / P. Zhu [et al.] // Chem. Eur. J. – 2010. – Vol. 16. – P. 3176 – 3183. – DOI: 10.1002/chem.200902139.

49. Modulated supramolecular assemblies composed of tripeptide derivatives: formation of micrometer-scale rods, nanometer-size needles, and regular patterns with molecular-level flatness from the same compound / K. Ariga [et al.] // *Langmuir*. – 2000. – Vol. 16. – P.4929-4939. – DOI: 10.1021/la000249u.
50. Sakurai, M. A new approach to molecular self-assembly through formation of dipeptide-based unique architectures by artificial supersaturation / M. Sakurai, P. Koley, M. Aono // *Chem. Commun.* – 2014. – Vol. 50. – DOI: 10.1039/C4CC05820H.
51. Epitaxial growth of peptide nanofilaments on inorganic surfaces: Effects of interfacial hydrophobicity/hydrophilicity / Zhang F [et al.] // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2006. - Vol. 45. – P. 3621 – 3623. – DOI: 10.1002/anie.200503636.
52. Влияние подложки и влажности воздуха на морфологию пленок дипептида L-лейцил-L-лейцин / М. А. Зиганшин [и др.] // *Физикохимия поверхности и защита материалов*. – 2014. – Том 50. – С.53-58. – DOI: 10.7868/S0044185624010173.
53. Effect of temperature on self-assembly of an ionic tetrapeptide / M. R. Tiné [et al.] // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2011. – Vol. 103. – P. 75–80. – DOI: 10.1007/s10973-010-1060-x.
54. Sidney, P. S. Surface-dependent differences in fibrin assembly visualized by atomic force microscopy / P. S. Sidney, R. E. Marchant // *Surface science*. – 2001. – Vol.491. – P. 421 – 432. – DOI: 10.1016/S0039-6028(01)01308-5.
55. Вознесенская, Исследование поверхностных свойств углеродных покрытий / А.А. Вознесенская, А.В. Жданов, В.В. Морозов. // *Современные проблемы науки и образования* Издательский Дом «Академия Естествознания» (Пенза). – 2015. – 1-8. – С. 199.
56. Швец, В.В.О контрасте сопротивления террас на графите / В. В. Швец, О. В. Сеницына, Г. Б. Мешков, И. В. Яминский // *ВМУ Серия 3. Физика. Астрономия*. – 2012. – №6. – С. 70-74.
57. Skvortsova, P.V. *Journal of Molecular Liquids* / P.V. Skvortsova [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2020. – Vol.319 – P.114178. – DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114178.



58. Alignment of aromatic peptide tubes in strong magnetic fields / R.J.A. Hill [et al.] // *Adv. Mater.* – 2007. – Vol.19. – P.4474-4479. – DOI: 10.1002/adma.200700590.
59. Chen, C. Functional architectures based on self-assembly of bio-inspired dipeptides: Structure modulation and its photoelectronic applications / C. Chen, K. Liu, J. Li, X. Yan // *Adv. Colloid. Interface Sci.* – 2015. – V.225 – P.177-193. – DOI: 10.1016/j.cis.2015.09.001.
60. Adler-Abramovich, L. The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications / L. Adler-Abramovich, E. Gazit // *Chem. Soc. Rev.* – 2014. – V.43. – P. 6873-7238. – DOI: 10.1039/C4CS00164H.
61. Gupta, S. (2020) Ultrashort Peptide Self-Assembly: Front-Runners to Transport Drug and Gene Cargos. / S. Gupta, I. Singh, A.K. Sharma, P. Kumar// *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – V.8. – DOI: 10.3389/fbioe.2020.00504
62. Lee, J.S. Self-assembling of semiconducting photoluminescent peptide nanowires in the vapor phase / J.S. Lee [et al.] // *Journal of Physics and Chemistry of Solids.* – 2016. – Vol.93. – P.68-72. – DOI: 10.1002/anie.201003446.
63. Fichman, G. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: Design of building blocks, physical properties and technological applications / G. Fichman, E. Gazit // *Acta Biomaterialia.* – 2014. – Vol.10. – P.1671-1682. – DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.013.
64. Zelenovskiy, P. S. Morphology and Piezoelectric Properties of Diphenylalanine Microcrystals Grown from Methanol-Water Solution / P. S. Zelenovskiy [et al.] // *Ferroelectrics.* – 2015. – Vol. 475, № 1. – P. 127-134. – DOI: 10.1080/00150193.2015.995577.
65. Арутюнов, П.А. Атомно-силовая микроскопия в задачах проектирования приборов микро- и наноэлектроники / П.А. Арутюнов, А.Л. Толстихина // *Микроэлектроника.* – 1999. – Том. 28. – С. 405-414.
66. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. М.: Техносфера, 2009. 144 с.

67. Магонов, С. Силовая микроскопия пьезоотклика в приложениях [Электронный ресурс] / С. Магонов // NT-MDT Spectrum Instruments. – 2017. – Режим доступа: <https://www.ntmdt-si.ru/resources/applications/piezoresponse-force-microscopy-in-its-applications>
68. Saurenbach, F. Imaging of ferroelectric domain walls by force microscopy / F. Saurenbach, B. D. Terris // Appl. Phys. Lett. – 1990. – Vol. 56. – P. 1703-1705. – DOI: 10.1063/1.103122.
69. Gruverman A., Scanning Force Microscopy for the Study of Domain Structure in Ferroelectric Thin Films / A. Gruverman, O. Auciello, H. Tokumoto // J. Vac. Sci. Technol. B – 1996. – Vol. 14. – P. 602-605. – DOI: 10.1116/1.589143.
70. Kalinin, S. V. Imaging mechanism of piezoresponse force microscopy of ferroelectric surfaces / S. V. Kalinin, D. A. Bonnell // Phys. Rev. B – 2002. – Vol. 65. – P.125408. – DOI: 10.1103/PhysRevB.65.125408.
71. Kholkin, A. L. Review of ferroelectric domain imaging by piezoresponse force microscopy (in Scanning Probe Microscopy, S. Kalinin, A. Gruverman, Eds.) / A. L. Kholkin, S. V. Kalinin, A. Roelofs, A. Gruverman. New York: Springer, 2007. – pp. 173-214.
72. Кудрявцев, А.В. Нелинейно-оптические свойства микрокристаллов глицина и фенилаланинов : дисс. ... канд. ф.-м.- наук : 01.04.07 / Кудрявцев Андрей Владимирович. – М., 2015. – 149 с.
73. Damjanovic, D. Ferroelectric, dielectric and piezoelectric properties of ferroelectric thin films and ceramics / D. Damjanovic // Rep. Prog. Phys. – 1998. – Vol. 62. – P. 1267-1324. – DOI: 10.1088/0034-4885/62/9/002.
74. Андреева Н. В., Габдуллин П. Г. Физика и диагностика биомолекулярных систем. Исследования методами зондовой микроскопии: учеб. пособие / Н.В. Андреева, П.Г.Габдуллин. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. – 179 с.
75. Asylum Research. Piezoresponse Force Microscopy with Asylum Research AFMs [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.asylumresearch.com/Applications/PFMAppNote/PFMAppNote.shtml>

76. Neese, F. The ORCA quantum chemistry program package / F. Neese, F. Wennmohs, U. Becker, C. Riplinger // *J. Chem. Phys.* – 2020. – Vol. 152. – P. 224108. – DOI: 10.1063/5.0004608.
77. Becke, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior / A.D. Becke // *Phys Rev A.* – 1988. – Vol. 38. – P. 3098-3100. – DOI: 10.1103/physreva.38.3098.
78. Perdew, J.P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas / J.P. Perdew // *Phys Rev B.* – 1986. – Vol. 33. – P. 8822-8824. – DOI: 10.1103/PhysRevB.33.8822.
79. Dunning, T.H. Gaussian basis sets for molecular calculations / T.H. Dunning, P.J. Hay. Boston: *Methods of electronic structure theory. Modern theoretical chemistry*, Springer, MA. 1977. – Vol. 3 – P.1-27. – DOI: 10.1007/978-1-4757-0887-5\_1.
80. Ryu, J. High stability of self-assembled peptide nanowires against thermal, chemical, and proteolytic attacks / J. Ryu, C. B. Park // *Biotechnol. Bioeng.* – 2010. – Vol.105. – P.221-230. – DOI: 10.1002/bit.22544.
81. Stephanie, M. G. Controlling Polymorphism in Pharmaceutical Compounds Using Solution Shearing / M. G. Stephanie, D.-M. Smilgies, G. Giri, // *Cryst. Growth Des.* – 2018. – Vol.18.– P.602-606. – DOI:10.1021/acs.cgd.7b01686.
82. Hughes E. W. The Crystal Structure of  $\beta$ -Glycylglycine / E. W. Hughes, W. J. Moor // *J. Am. Chem. Soc.* – 1949. – Vol.71. – 2628-2623. – DOI: 10.1021/ja01176a005.
83. Linstrom P. J. Eds., NIST Chemistry WebBook. // P. J. Linstrom, W. G. Mallard NIST Standard Reference Database No. 69 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, 2018), <http://webbook.nist.gov> (accessed Apr. 10, 2018).
84. Hirata M. Computer Aided Data Book of Vapor-Liquid Equilibria // M. Hirata, S. Ohe, K. Nagahama. – Tokyo: Kodansha Limited, 1975.
85. Babu, N. J. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals/ N. J. Babu, A. Nangia // *Cryst. Growth Des.* – 2011. – Vol.11. – P. 2662. – DOI: 10.1021/cg200492w.

86. Hassan, M. A. Characterization of glibenclamide glassy state / M. A. Hassan, N. M. Najib, M. S. Suleiman // *Int. J. Pharm.* – 1991. – Vol. 67. – P.131. – DOI: 10.1016/0378-5173[91]90425-N.
87. Gataullina, K. V. Smart Polymorphism of Thiocalix[4]arene with Long-Chain Amide Containing Substituents/ K. V. Gataullina [et al.] // *Cryst. Growth Des.* – 2017. – Vol.17. – P.3512. – DOI: 10.1021/acs.cgd.7b00463.
88. Andronis V., Yoshioka M., and Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, 86, 346 (1997).
89. Hansen C., *Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook*, 2nd ed. / C. Hansen. – New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007.
90. Safiullina, A. S. Role of water in the formation of unusual organogels with cyclo(leucyl–leucyl) / A. S. Safiullina [et al.] // *Soft Matter*. – 2019. – Vol.15. – P.3595. – DOI: 10.1039/c9sm00465c.
91. Ziganshin, M.A. The effect of a substrate on the morphology of dipeptide (L-valyl-L-alanine) films before and after their interaction with pyridine vapor / M.A. Ziganshin [et al.] // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2013. – Vol. 49. – P. 274-279. – DOI: 10.1134/S2070205113030179.
92. Chatterjee A., Zhang L., Leung K.T. Bidentate Surface Structures of Glycylglycine on Si(111)7×7 by HighResolution Scanning Tunneling Microscopy: Site-Specific Adsorption via N–H and O–H or Double N–H Dissociation // *Langmuir*. – 2012. – Vol. 28. – P. 12502-12508.
93. Amadei C.A. [et al.] Time dependent wettability of graphite upon ambient exposure: The role of water adsorption // *J. Chem.Phys.* – 2014. – Vol. 141. – P. 084709.
94. Parobek D., Liu H. Wettability of graphene// *2D Mater.* – 2015. – Vol. 2. – P. 032001.
95. Rafiee J. [et al.] Superhydrophobic to superhydrophilic wetting control in graphene films // *Adv. Mater.* – 2010. – Vol. 22. – P. 2151-2154.
96. Sit P.S., Marchant R.E. Surface-dependent differences in fibrin assembly visualized by atomic force microscopy // *Surf. Sci.* – 2001. – Vol. 491. – P. 421-32.
97. Liu L., Buckley J.S.// *J. Petroleum Science and Engineering*. 1999. V. 24. P. 75.

98. Silverio V., Canane P.A.G., Cardoso S. Surface wettability and stability of chemically modified silicon, glass and polymeric surfaces via room temperature chemical vapor deposition // *Colloids Surf. A.* – 2019. – Vol. 570. – P. 210-217.
99. Aronov D., Rosenman G. // *J. Appl. Phys.* 2007. V. 101. P. 084901-1.
100. Callaghan, I.C. Liquid/liquid/solid contact angles measured by interference microscopy / I.C. Callaghan, D.H. Everett, A.J.P. Fletcher // *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* – 1983. – Vol. 79. – P. 2723-2728. – DOI: 10.1039/F19837902723.
101. Boldyrev, A.E. Microspheres based on a protein matrix and dipyrindamole with possible inhalation administration / A.E. Boldyrev [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* – 2021. – Vol. 55. – P. 942-946. – DOI: 10.1007/s11094-021-02519-5.
102. Bernal, J. D. The Crystal structure of the natural amino acids and belated compounds / J. D. Bernal // *Z. Kristallogr. Cryst. Mater.* – 1931. – Vol. 78. – P. 363. – DOI: 10.1524/zkri.1931.78.1.363.
103. Sharma, P. Study of hydration of sarcosine, formation of its zwitterion and their different oligomers in aqueous media: A Raman spectroscopic and theoretical study / P. Sharma [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2013. – Vol. 116. – P.74-83. –DOI: 10.1016/j.saa.2013.06.041.
104. Sjöberg, B. An experimental and theoretical study of the amino acid side chain Raman bands in proteins / B. Sjöberg, S. Foley, B. Cardey, M. Enescu // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2014. –Vol. 128. – P.300-311. – DOI: 10.1016/j.saa.2014.02.080.
105. Hernández, B. Protonation–deprotonation of the glycine backbone as followed by Raman scattering and multiconformational analysis / B. Hernández, F. Pflüger, S. G. Kruglik, M. Ghomi // *Chemical Physics.* – 2013. – Vol. 425. P. 104-113. – DOI: 10.1016/j.chemphys.2013.08.008.
106. Baran, J. The polarized IR and Raman spectra of the diglycine hydrochloride crystal / J. Baran, A. J. Barnes, H. Ratajczak // *Journal of Molecular Structure.* –2012. – Vol. 1009. – P.55-68. – DOI:10.1016/j.molstruc.2011.09.016.

107. Holtz, J. S. W. UV resonance Raman studies of cis-to-trans isomerization of glycyglycine derivatives / J. S. W. Holtz, P. Li, S. A. Asher // J. Am. Chem. Soc. – 1999. – Vol. 121. – P. 3762-3766. – DOI: 10.1021/ja984003b/.
108. Kojima, K. Measuring methods of infinite dilution activity coefficients and a database for systems including water / K. Kojima, S. Zhang, T. Hiaki // Fluid Phase Equilibria. – 1997. – Vol. 131. – P. 145-179. – DOI: 10.1016/S0378-3812(96)03210-4.
109. Romanyuk, K. Piezoactive dense diphenylalanine thin films via solid-phase crystallization// K. Romanyuk [et al.] // Applied Materials Today. – 2022. – Vol.26. – P.101261. – DOI: 10.1016/j.apmt.2021.101261.
110. Bosne, E. D. Piezoelectric resonators based on self-assembled diphenylalanine microtubes / E. D. Bosne [et al.] // Applied Physics Letters. – 2013. – Vol. 102. – P. 073504. – DOI: 10.1063/1.4793417.