

## РЕАКЦИИ НА ПОВЕРХНОСТИ

УДК 544.4; 544.722; 577.15; 53.086; 542.943.7

# ИССЛЕДОВАНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2020 г. Л. И. Матиенко<sup>1\*</sup>, Е. М. Миль<sup>1</sup>, В. И. Бинюков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: matienko@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 23.10.2019;

после доработки 23.10.2019;

принята в печать 20.11.2019

Предложен новый подход к изучению методом АСМ супрамолекулярных комплексов и возможной роли водородных связей при образовании наноструктур металлокомплексов, моделирующих активные центры ферментов. Образование таких структур происходит за счет нековалентных межмолекулярных взаимодействий и в определенной степени отражает строение комплексов, участвующих в механизмах реакций гомогенного и ферментативного катализа.

*Ключевые слова:* метод АСМ, супрамолекулярные структуры, Н-связи, гомогенный катализ, гетеролигандные комплексы, никель, железо, модели ферментов.

DOI: 10.31857/S0207401X20060084

### ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) стала широко используемым методом для характеристики различных свойств биологических, органических и неорганических материалов, связанных с поверхностью [1]. Метод АСМ способствовал развитию нанотехнологии как дисциплины и до сих пор регулярно используется для изучения наноматериалов, таких как углеродные нанотрубки и графен.

Супрамолекулярная химия на поверхности – это область исследований, доля которых значительно выросла за последние годы. В недавних исследованиях была разработана концепция использования супрамолекулярных взаимодействий, включая координационные, галогеновые и водородные связи, для управления молекулярной организацией на поверхностях [2].

Механизм катализа часто включает в себя образование супрамолекулярных структур за счет водородных связей в процессе каталитической реакции. Супрамолекулярные структуры открывают весьма перспективное направление анализа нековалентных взаимодействий [3].

Нами предложен новый подход к изучению методом АСМ супрамолекулярных комплексов и роли водородных связей при образовании супрамолекулярных структур на основе металлокомплексов, являющихся катализаторами процессов окисления и моделями активных центров ферментов, а также к изучению структурных измене-

ний клеток. В настоящем сообщении коротко представлены результаты АСМ-исследований авторов, полученные за последние 7 лет.

В АСМ-исследованиях использовали атомно-силовую микроскоп SOLVER P47/SMENA/ с кремниевым кантиливером NSG11S (NT MDT), радиусом кривизны 10 нм, высотой наконечника 10–15 мкм и углом конуса  $\leq 22^\circ$ ; в режиме записи на пленку была использована резонансная частота в 150 кГц. Топографические изображения объектов получены в режиме “tapping mode” [4]. С целью изучения возможности связывания с поверхностью и дальнейшего роста за счет межмолекулярных Н-связей супрамолекулярных структур на основе гетеролигандных комплексов никеля и железа была использована гидрофобная химически модифицированная кремниевая поверхность в качестве субстрата.

Образование супрамолекулярных структур на поверхности обусловлено балансом между взаимодействиями молекул с поверхностью и межмолекулярными взаимодействиями [5]. Если межмолекулярных связей нет или они слабы, то роста стабильных структур практически не происходит. Разработаны методы фиксации на поверхности за счет Н-связей и количественной оценки размерных параметров растительных митохондрий и эритроцитов. Получены топографические изображения объектов в режиме “tapping mode”.

## РОЛЬ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР В МЕХАНИЗМАХ КАТАЛИЗА ГЕТЕРОЛИГАНДНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ НИКЕЛЯ РЕАКЦИЙ ОКИСЛЕНИЯ АЛКИЛАРЕНОВ МОЛЕКУЛЯРНЫМ КИСЛОРОДОМ

Проблема снижения активности гомогенного катализатора в ходе реакции окисления углеводородов молекулярным кислородом — одна из основных проблем катализа, так как функционирование катализатора всегда сопровождается процессами его дезактивации [5]. Метод модификации металлокомплексных катализаторов, направленный на повышение селективности и степени конверсии окисления этилбензола в соответствующие гидропероксиды, впервые предложенный Л.И. Матиенко [5], заключается во введении дополнительных моно- или мультидентатных модифицирующих лигандов  $L^2$  в каталитические комплексы  $ML_n^1$ , где  $M = Ni^{II}, Fe^{II,III}$ ,  $L^1 = acac^-, enamac^-$ . Исследован механизм действия  $L^2$  и разработаны новые эффективные катализаторы селективного окисления этилбензола в  $\alpha$ -фенилэтил гидропероксид (ФЭГ). Механизм катализа заключается в формировании *in situ* первичных комплексов  $(M^{II}L^1)_x(L^2)_y$  и образовании эффективных гетеролигандных комплексов  $M_x^I L_y^1 (L_{ox}^1)_z (L^2)_n (H_2O)_m$ , которые являются промежуточными продуктами окисления комплексов  $(M^{II}L^1)_x(L^2)_y$  кислородом в ходе процесса окисления этилбензола [5]. Наиболее эффективными каталитическими системами селективного окисления этилбензола в ФЭГ молекулярным кислородом являются трехкомпонентные системы  $\{Ni(acac)_2 + L^2 + PhOH\}$  ( $L^2 = NMP$  (N-метил-2-пирролидон), НМРА, МSt;  $M = Na, Li$ )<sup>1)</sup> [5, 6]. Эти системы включают в себя фенол в качестве третьего компонента. Образование комплексов  $Ni(acac)_2 \cdot L^2 \cdot PhOH$  доказано кинетически. Тройные системы не окисляются молекулярным кислородом и очень стабильны в ходе процесса окисления этилбензола.

Мы предположили, что высокая эффективность катализаторов  $Ni_x L_y^1 (L_{ox}^1)_z (L^2)_n (H_2O)_m$  ( $L^1 = acac^-, L_{ox}^1 = CH_3COO^-$ ) и  $Ni(acac)_2 \cdot L^2 \cdot PhOH$  в процессе селективного окисления RH в ФЭГ могла быть связана с образованием устойчивых супрамолекулярных структур за счет межмолекулярных водородных связей и, возможно, других нековалентных взаимодействий [5]. Действительно, методом

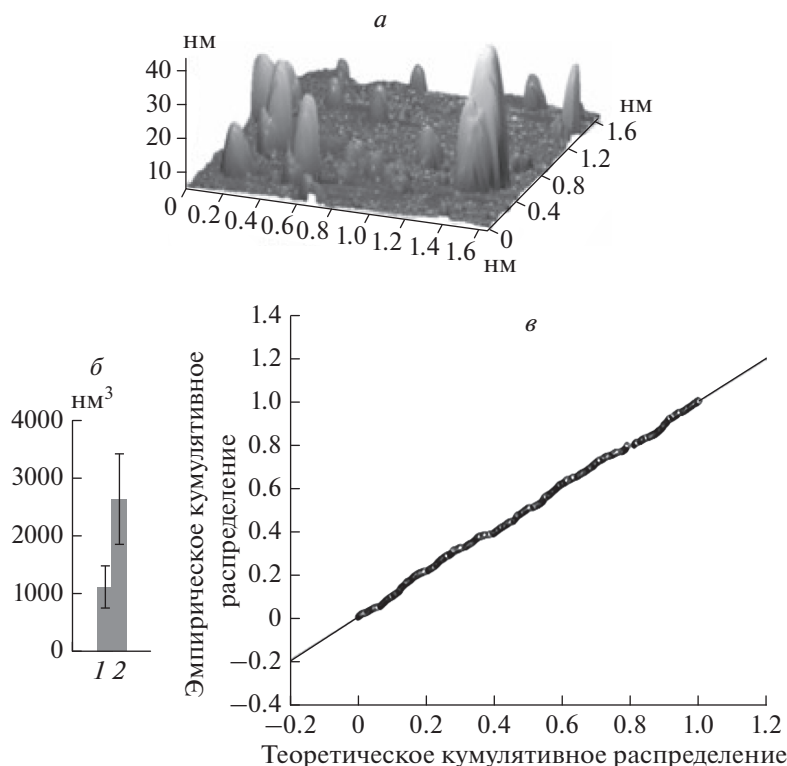
<sup>1)</sup> Матиенко Л.И., Мосолова Л.А. Способ получения альфа-фенилгидропероксида из этилбензола. Патент на изобретение № 2237050. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 сентября 2004 г. Приоритет от 3 декабря 2002 г.

АСМ зарегистрирована самоорганизация супрамолекулярных структур на основе  $Ni_2(acac)(OAc)_3 \cdot NMP \cdot 2H_2O$  ( $Ni_x L_y^1 (L_{ox}^1)_z (L^2)_n (H_2O)_m$ ,  $L^2 = NMP$ ), а также тройных комплексов  $Ni(acac)_2 \cdot L^2 \cdot PhOH$  ( $L^2 = NMP, HMPA, MSt$ ;  $M = Na, Li$ ) в очень стабильные супрамолекулярные структуры (с максимальной высотой  $h$  частиц — до 100 нм). Полученные АСМ-данные указывают на высокую вероятность образования стабильных супрамолекулярных структур на основе гетеролигандных комплексов никеля  $Ni_2(acac)(OAc)_3 \cdot NMP \cdot 2H_2O$  и  $Ni(acac)_2 \cdot L^2 \cdot PhOH$  за счет межмолекулярных H-связей и, возможно, других нековалентных взаимодействий в реальных условиях каталитического окисления [4, 7].

## ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ РОЛЬ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР В МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ НА ОСНОВЕ АСМ-ДАНЫХ

Ранее мы установили механизм окислительной трансформации комплексов никеля и железа, активированных добавками электронодонорных лигандов  $((M^{II}L^1)_x(L^2)_y)$  в процессе окисления этилбензола молекулярным  $O_2$  [5]. Маршруты превращения комплексов различны, но приводят к образованию аналогичных гетеролигандных комплексов:  $M_x^I L_y^1 (L_{ox}^1)_z (L^2)_n (H_2O)_m$  ( $L_{ox}^1 = OAc^-$ ). В случае  $M = Ni$  присоединение  $O_2$  по  $\gamma$ -C-атому одного из  $(acac)^-$  лигандов приводит к разрыву образующейся циклической конфигурации с образованием хелатного иона  $L_{ox}^1 = (OAc)^-$ , ацетальдегида и элиминированием CO (через Criegee перегруппировку) по аналогии с механизмом действия Ni-ARD — ациредуктон диоксигеназы [8] или Cu- и Fe-содержащих кверцетин-2,3-диоксигеназ [8, 9]. Гипотетический механизм трансформации комплекса железа в результате присоединения  $O_2$  по  $\gamma$ -C-атому  $(acac)^-$ -лиганда включает в себя образование интермедиата, содержащего 1,2-диоксетановый фрагмент, с последующим его распадом на хелатный  $(OAc)^-$  лиганд и метилглиоксаль без образования CO [9] по аналогии с действием Fe-ациредуктон диоксигеназы (Fe-ARD) и Fe-ацетилацетон диоксигеназы (Dke 1) [8, 9].

Ациредуктон-диоксигеназы Ni(Fe)-ARD являются ферментами, участвующими в универсальном процессе превращения серосодержащих метаболитов в метионин (methionine salvage pathway (MSP)). Оба фермента Ni(Fe)-ARD являются членами структурного суперсемейства, известного как “cupins” (купины), включающего Dke 1 и цистеин диоксигеназу. Семейство купинов использует три лиганда гистидина (His), а также один или два атома кислорода из воды и кислоро-



**Рис. 1.** *a* – Трехмерное АСМ-изображение наноструктур ( $h = 40$  нм) на основе тройных систем  $\{\text{Ni}(\text{acac})_2 + \text{His} + \text{Tyr}\}$  ( $\text{His} = \text{L-гистидин}$ ,  $\text{Tyr} = \text{L-тирозин}$ ); *b* – диаграмма средних значений объемов частиц на основе бинарных (1)  $\{\text{Ni}(\text{acac})_2 + \text{His}\}$  и тройных (2) систем  $\{\text{Ni}(\text{acac})_2 + \text{His} + \text{Tyr}\}$  (на диаграмме – 95%-ный доверительный интервал); *c* – эмпирическое и теоретическое кумулятивное логнормальное распределение объемов частиц на основе системы  $\{\text{Ni}(\text{acac})_2 + \text{His} + \text{Tyr}\}$ .

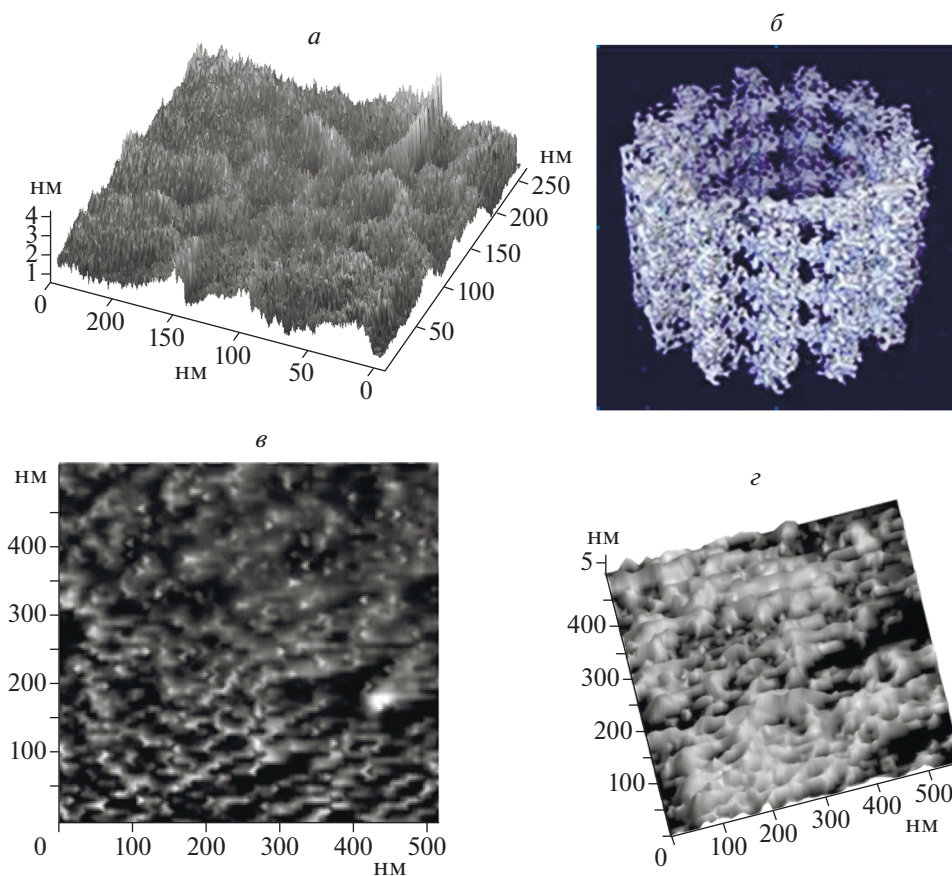
да карбоксилатной группы (Glu) для связывания с Fe(Ni)-центром [8, 9]. В зависимости от природы иона металла в активном месте ферменты различаются структурой и механизмом действия в отношении общих субстратов (1,2-дигидрокси-3-оксо-5 (метилтио) пент-1-ен ( $\beta$ -дикетон ациредуктон) и молекулярный кислород) [8]. По аналогии с действием Dke1 фермент Fe-ARD катализирует присоединение  $\text{O}_2$  к ациредуктону с образованием формиата и 2-кето-4-(тиометил) бутирата, предшественника метионина. Фермент Ni-ARD катализирует трансформацию, не приводящую к образованию метионина. В результате этой реакции образуется CO, являющийся нейротрансмиттером, который идентифицирован в качестве антиапоптозной молекулы у млекопитающих [8].

Поскольку комплексы  $(\text{M}^{\text{II,III}}\text{L}_n^1)_x \cdot (\text{L}^2)_y$ ,  $\text{M}_x^{\text{II}}\text{L}_y^1(\text{L}_{ox}^1)_z(\text{L}^2)_n(\text{H}_2\text{O})_m$  ( $\text{M} = \text{Ni}, \text{Fe}$ ),  $\text{Ni}(\text{acac})_2 \cdot \text{L}^2 \cdot \text{PhOH}$  являются структурными и функциональными моделями активных центров Ni(Fe)-ARD, результаты АСМ-исследований могут быть полезными при объяснении механизма действия этих ферментов. Образование многомерных форм может

быть одним из возможных способов регулирования активности ферментов Ni(Fe)-ARD в цикле MSP. Так, с формированием стабильных структур, подобных  $\text{Ni}_2(\text{acac})(\text{OAc})_3 \cdot \text{NMP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [4], может быть связано снижение активности Ni-ARD в цикле MSP. Мы впервые высказали предположение о том, что, рассматривая механизм действия ферментов Ni(Fe)-ARD, необходимо принимать во внимание роль их второй координационной сферы, включающей фрагмент тирозин (Tyr). Например, участие Tyr-фрагмента предполагалось в действии Homoprotocatechuate 2,3-диоксигеназы [7].

Образованием стабильных супрамолекулярных структур за счет H-связей на основе модельных комплексов  $\{\text{Ni}(\text{acac})_2 \cdot \text{L}^2 \cdot \text{L}^3\}$  ( $\text{L}^2 = \text{NMP}$ ,  $\text{HMPA}$ ,  $\text{L}^3 = \text{PhOH}$ ), и  $\{\text{Ni}(\text{acac})_2 \cdot \text{L}^2 \cdot \text{Tyr}\}$  ( $\text{L}^2 = \text{NMP}$ ,  $\text{His}$ ), можно объяснить снижение активности Ni-ARD и регуляторную роль Tyr- и His-фрагментов (рис. 1) [7, 10]. Данные УФ-спектроскопии свидетельствуют о внутри- и внешне-сферной координации экстралигандов Tyr и His с  $\text{Ni}(\text{acac})_2$  [10].

В случае катализа Fe-ARD самоорганизация комплексов железа в супрамолекулярные структуры



**Рис. 2.** *a* – Трехмерное АСМ-изображение наноструктур ( $h = 4$  нм) на основе комплексов  $\text{Fe}_x^{\text{III}}(\text{асас})_y, 18\text{C}6_m(\text{H}_2\text{O})_n$ ; *б* – структура клеточных микротрубочек; *в* и *г* – двух- и трехмерное изображения наноструктур ( $h = 5$  нм) на основе тройных комплексов  $\text{Fe}_x^{\text{III}}(\text{асас})_y(\text{His})_m(\text{Tyr})_n(\text{H}_2\text{O})_p$  ( $\text{His} = \text{L-гистидин}$ ,  $\text{Tyr} = \text{L-тирозин}$ ).

может благоприятствовать реакциям, приводящим к образованию метионина. Методом АСМ нами установлена самоорганизация за счет Н-связей комплексов  $\text{Fe}_x^{\text{III}}(\text{асас})_y, 18\text{C}6_m(\text{H}_2\text{O})_n$  и  $\text{Fe}_x^{\text{III}}(\text{асас})_y(\text{His})_m(\text{Tyr})_n(\text{H}_2\text{O})_p$ , моделирующих активный центр Fe-ARD, в супрамолекулярные структуры, напоминающие по форме трубочки белка тубулина (рис. 2) [10]. Бинарные системы  $\{\text{Fe}(\text{асас})_3 + \text{His}\}$  в отсутствие L-тирозина образуют менее четкие структуры, характеризующиеся меньшей стабильностью.

Мы предположили, что механизм действия Fe-ARD включает в себя стадию активации кислорода  $\text{Fe}^{\text{II}} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^-$  по аналогии с механизмом, предполагаемым для Dke1 [9]. Образование структур, подобных трубочкам тубулина, как это происходит, например, в случае формирования модельных комплексов  $\text{Fe}_x^{\text{III}}(\text{асас})_y, 18\text{C}6_m(\text{H}_2\text{O})_n$  и  $\text{Fe}_x^{\text{III}}(\text{асас})_y(\text{His})_m(\text{Tyr})_n(\text{H}_2\text{O})_p$  (рис. 2), может способствовать активации  $\text{O}_2$ , региоселективному

присоединению активированного  $\text{O}_2$  к ациредуктон лиганду и последующим реакциям, ведущим к образованию метионина.

Н-связывание в случае порфиринов – это тип связи, который обычно наблюдается в природе. Одним из наиболее простых искусственных типов самоорганизующихся супрамолекулярных порфириновых систем является димер, образующийся на основе функциональной группы карбоновой кислоты [11]. Согласно литературным данным о регуляторной роли Туг-фрагмента в функционировании ферментов (гемовых белков) семейства P450 [12], возможно формирование наноструктур на модифицированной кремниевой поверхности за счет Н-связей на основе модельных тройных систем, включающих Туг-фрагмент. Мы действительно наблюдали самоорганизацию модельных систем  $\{\text{Нем} + \text{Туг} + \text{His}\}$  ( $\text{Нем} = \text{гемин}$ ) в стабильные наноструктуры (рис. 3,  $h = 20\text{--}30$  нм). Интересно, что самоорганизация двойных систем  $\{\text{Нем} + \text{Туг}\}$  и  $\{\text{Нем} + \text{His}\}$  на модифицированной кремниевой поверхности не наблюдается.

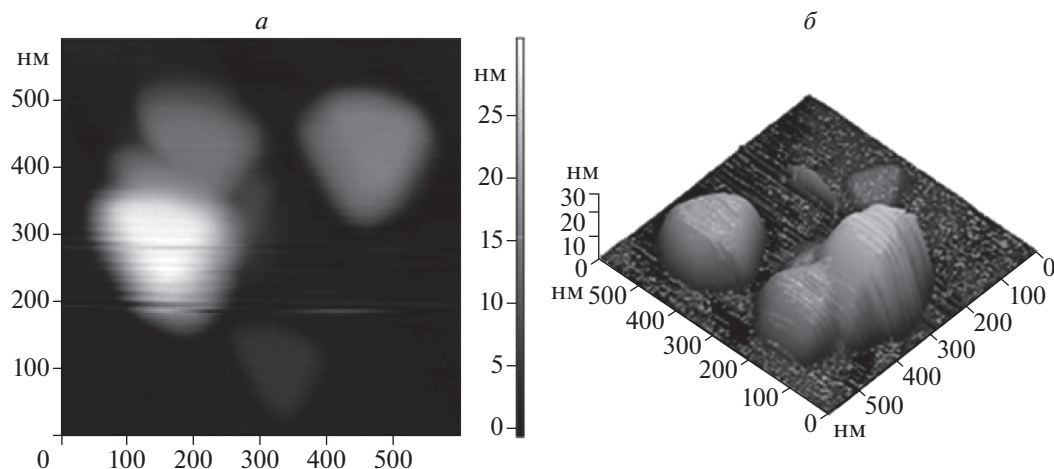


Рис. 3. Двумерное (а) и трехмерное (б) АСМ-изображение наноструктур ( $h = 30$  нм) на основе тройных систем {Hem + Tug + His} (Hem = гемин, Tug = L-тирозин, His = L-гистидин).

### ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОК МЕТОДОМ АСМ

С помощью метода АСМ обнаружено увеличение размеров митохондрий (способное привести к программированной клеточной смерти – апоптозу) при стрессовых воздействиях холодом ( $14^{\circ}\text{C}$ ) и недостаточном увлажнении, которые предотвращались действием антиоксидантов и стимуляторами роста растений. Методом АСМ обнаружены изменения функционального состояния эритроцитов мыши, при гликолитическом голодании и в процессе опухолевого роста при трансплантации клеток карциномы Льюис. Прослежено изменение морфологии эритроцитов при введении мышам *in vivo* водных растворов антиоксидантов, синтезированных в ИБХФ РАН, таких как фенозан калия, ИХФАН-10 и анфен натрия, в большом диапазоне их концентраций. Актуальность таких исследований связана с тем, что фенозан калия введен в медицинскую практику как противосудорожный препарат, в то время как анфен натрия, как показано нами, является перспективным противоопухолевым препаратом, вызывающим апоптоз по митохондриальному пути, воздействуя на белки семейства Bcl-2 [13–15].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход – метод АСМ для изучения возможности образования супрамолекулярных структур, а также роли межмолекулярных водородных связей (и других нековалентных взаимодействий) в механизмах реакций гомогенного и ферментативного катализа гетеролигандными комплексами никеля и железа. Факт образования на поверхности супрамолекулярных структур, полученных на основе комплексов никеля и железа за счет межмолекулярных водородных связей и, возможно,

других нековалентных взаимодействий, свидетельствует о высокой вероятности образования подобных структур в реальных условиях каталитического окисления. Полученные АСМ-данные для комплексов никеля и железа, моделирующих активные центры ферментов, могут приблизить нас к пониманию механизмов действия ферментов Ni(Fe)-ARD, в частности роли Tug- и His-фрагментов в синтезе метионина и CO, а также в функционировании ферментов семейства P450. Разработаны методические подходы атомно-силовой микроскопии для изучения структурных изменений клеток.

Часть работы, касающаяся АСМ-исследования роли супрамолекулярных структур в механизмах ферментативного катализа, получила финансовую поддержку РАН 14П (номер НИОКТР: АААА-А17-117121920169-0).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atomic Force Microscopy for materials. Microscopy EKB Series Editor: Dr Julian Heath Spectroscopy and Separations EKB Series / Ed. Taylor N. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., PO19 8SQ, UK, 2017.
2. Slater A.G., Perdigão L.M.A., Beton P.H. et al. // Acc. Chem. Res. 2014. V. 47. № 12. P. 3417.
3. Biedermann F., Schneider H.-J. // Chem. Rev. 2016. V. 116. № 9. P. 5216.
4. Matienko L.I., Binyukov V.I., Mosolova L.A. et al. // Chem. and Chem. Tech. 2014. V. 8. № 3. P. 339.
5. Matienko L.I., Mosolova L.A., Zaikov G.E. Selective Catalytic Hydrocarbons Oxidation. New Perspectives, New York: Nova Science Publ. Inc. USA, 2010.
6. Matienko L.I., Binyukov V.I., Mosolova L.A. // Oxid. Commun. 2014. V. 37. № 1. P. 20.
7. Matienko L.I., Binyukov V.I., Mosolova L.A. et al. // Oxid. Commun. 2017. V. 40. № 2. P. 569.

8. *Deshpande A.R., Pochapsky T.C., Ringe D.* // Chem. Rev. 2017. V. 117. № 15. P. 10474.
9. *Leitgeb St., Straganz G.D., Nidetzky B.* // Fed. European Biochem. Soc. J. 2009. V. 276. № 20. P. 5983.
10. *Matienko L.I., Binyukov V.I., Mil E.M. et al.* // Oxid. Commun. 2018. V. 41. № 3. P. 429.
11. *Beletskaya I.P., Tyurin V.S., Tsivadze A.Yu. et al.* // Chem. Rev. 2009. V. 109. № 5. P. 1659.
12. *Basom E.J., Manifold B.A., Thielges M.C.* // Biochemistry. 2017. V. 56. № 25. P. 3248.
13. *Бинюков В.И., Миль Е.М., Жигачева И.В. и др.* // Докл. РАН. 2012. Т. 446. № 2. С. 222.
14. *Миль Е.М., Бинюков В.И., Жигачева И.В. и др.* // Вестн. Казанск. технол. ун-та. 2013. № 3. С. 141.
15. *Mil E.M., Erokhin V.N.* // Bull. Exp. Biol. and Med. 2018. V.164. № 5. P. 673;  
<https://doi.org/10.1007/s10517-018-4056-3>