

УДК 539.2

РЕНТГЕНОВСКОЕ МАЛОУГЛОВОЕ РАССЕЙАНИЕ, СИНХРОТРОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ И СТРУКТУРА БИО- И НАНОСИСТЕМ

© 2011 г. Д. И. Свергун *, Э. В. Штыкова, В. В. Волков, Л. А. Фейгин

* Европейская лаборатория молекулярной биологии, Гамбург, Германия

E-mail: svergun@embl-hamburg.de

Институт кристаллографии РАН, Москва, Россия

E-mail: feigin@ns.crys.ras.ru

Поступила в редакцию 07.04.2011 г.

Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей – универсальный дифракционный метод исследования надатомной структуры веществ, возможности которого неизмеримо выросли в последние годы благодаря появлению ярких источников синхротронного излучения. Широкое применение этих источников, в совокупности с новыми методиками анализа данных рассеяния и построения структурных моделей, сделали малоугловое рассеяние одним из самых эффективных аналитических методов анализа наноразмерных структур. После краткого изложения основных принципов малоуглового рассеяния изотропными дисперсными наносистемами в работе рассмотрены две области нанодиагностики, где прогресс в малоугловом эксперименте и новейшие методики интерпретации данных рассеяния рельефно проявились в последние годы. Эти направления – анализ строения биологических макромолекул в растворе и структурные исследования синтезированных металлических наночастиц в полимерных и водных носителях – проиллюстрированы примерами практических биологических и нанотехнологических приложений.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.

1. Основы теории малоуглового рентгеновского рассеяния.

1.1. Теоретические основы метода.

1.2. Инварианты и моделирование монодисперсных систем.

1.3. Полидисперсные системы и смеси.

2. Современные методы структурной интерпретации данных малоуглового рассеяния.

2.1. Обратная задача рассеяния и сферические гармоники.

2.2. Прямое восстановление формы.

2.3. Метод молекулярной тектоники.

3. Рентгеновские источники и установки для малоуглового эксперимента.

3.1. Традиционные установки для малоуглового рассеяния.

3.2. Некоторые характеристики синхротронного малоуглового эксперимента.

3.3. Синхротронные малоугловые дифрактометры.

4. Структурные приложения современного малоуглового рассеяния.

4.1. Исследования биологических макромолекул и их комплексов в растворе.

4.1.1. Первые применения прямых методов анализа.

4.1.2. Определение формы как основной инструмент малоуглового рассеяния в биологии.

4.1.3. Молекулярная тектоника и совместное использование малоуглового рассеяния с другими методами.

4.2. Исследование полимерных нанокомпозиций.

4.2.1. Процессы формирования и стабилизации металлических наночастиц в самоорганизующихся полимерных матрицах.

4.2.2. Металлизированные мицеллярные системы.

4.2.3. Монодисперсные ферромагнитные наночастицы в растворе, стабилизированные биodeградируемыми полимерами.

Заключение.

ВВЕДЕНИЕ

Рентгеновское излучение дает самые различные возможности анализа внутреннего строения разнообразных веществ и материалов. В частности, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия широко используется для изучения электронной структуры, флуоресценция – для качественного и количественного анализа состава веществ. Для исследования поверхностных слоев помимо рентгеновской рефлектометрии все более широко применяется метод стоячих рентгеновских волн, позволяющий с высокой точно-

стью локализовывать типы атомов и их координаты в направлении, перпендикулярном плоскости образца [1, 2]. В структурных исследованиях применяются методы рентгеновской дифракции и рассеяния, основанные на эффектах упругого взаимодействия рентгеновских лучей со связанными электронами в образце. Для структурного анализа используется достаточно жесткое излучение с длиной волны λ порядка ~ 0.1 нм, что близко к межатомным расстояниям. Для многих кристаллических объектов методы рентгеновской кристаллографии позволяют определять их структуру в виде трехмерного распределения электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$. Рентгеновская кристаллография началась пионерскими работами М. Лауэ в 1912 г. на кристаллах сульфата меди [3] и прошла путь, позволяющий в настоящее время определять структуры таких сложнейших макромолекулярных объектов, как рибосома при атомном разрешении [4].

Дифракция на кристаллических объектах дает трехмерную картину рентгеновской интенсивности $I(\mathbf{s})$, состоящую из набора рефлексов вдоль определенных направлений вектора рассеяния \mathbf{s} . Эти рефлексы можно измерять до высокого разрешения, что собственно и дает возможность восстановления трехмерной структуры при атомном разрешении после решения фазовой проблемы [5], рассмотрению которой посвящено большое число работ. Разупорядоченные системы рефлексов, как правило, не дают, и измеряемая картина рассеяния — это достаточно гладкая, часто изотропная функция $I(s)$ (здесь $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$ — модуль вектора рассеяния или перенос момента, а 2θ — угол рассеяния). В 1938 г. французский ученый А. Гинье обнаружил, что центральная часть дифракционной картины содержит довольно сильное рассеяние при наличии в веществе высокодисперсных зерен (как сейчас бы сказали, наночастиц) с размерами в десятки нанометров [6]. Эти работы положили начало методу малоуглового рентгеновского рассеяния (МУР), который позволяет исследовать вещества самой разнообразной структуры, содержащие неоднородности размерами в диапазоне $1-10^3$ нм. Чем больше размер рассеивающего объекта, тем в меньшем угловом интервале сосредоточено рассеянное излучение (номинальное разрешение d , отвечающее переносу момента s , определяется соотношением $d = 2\pi/s$). Соответственно рассеяние на малые углы (меньше нескольких градусов) несет информацию о “крупномасштабных” (по отношению к длине волны излучения λ) рассеивающих объектах, и МУР дает структурную информацию с разрешением до $1-2$ нм. Измерение интенсивности рентгеновского МУР представляет собой сложную техническую задачу, поскольку приходится регистрировать достаточно слабое рассеяние вблизи мощного первичного пучка излучения.

Сам по себе факт, что МУР обнаружено почти на 30 лет позже начала рентгеновских работ по кристаллографии, связан именно с отсутствием ярких рентгеновских источников. А. Гинье смог открыть МУР в первую очередь потому, что сконструировал специальную камеру с низким собственным уровнем фона. Неудивительно, что рентгеновское МУР принадлежит к методам, которые смогли полностью раскрыть свои возможности с появлением источников синхротронного излучения (СИ), начиная с 1980-х гг.

СИ обладает целым рядом важнейших преимуществ по сравнению с излучением рентгеновских трубок, в первую очередь неизмеримо более высокой интенсивностью и яркостью пучка фотонов. Достоинства СИ и его применения в МУР более подробно рассмотрены в разд. 3.

Применение МУР в исследовании биополимеров начало активно развиваться в 60–70-е гг. Это было связано с развитием молекулярной биологии и, прежде всего, с получением высокоочищенных препаратов белков, рибосом, вирусов. Размеры этих объектов лежат в области от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров, и растворы таких биополимеров весьма близки к теоретической системе идентичных наночастиц. В это время в Институте кристаллографии удалось показать на модельных расчетах, что интенсивность малоуглового рассеяния сильно зависит не только от размера частицы и ее формы, но и от внутренней структуры наночастицы. По данным малоуглового рассеяния построены структурные модели ряда белков, рибосом и нескольких бактериальных вирусов — бактериофагов. Эти последние объекты размером в несколько десятков нанометров были исследованы особенно подробно. В результате удалось прецизионно определить форму белковой оболочки бактериофагов Сд и Т7, размер отростка и особенности укладки РНК внутри вируса. Для осуществления этих исследований были разработаны и построены первые автоматические рентгеновские малоугловые дифрактометры и предложены программы обработки данных малоуглового рассеяния и построения моделей строения различных наночастиц. Высокая информативность определения структуры бактериофага Т7 [7] спустя 25 лет была подтверждена при использовании новейшего низкотемпературного электронно-микроскопического метода получения трехмерных изображений [8] (разд. 4.1).

Одновременно продолжались экспериментальные исследования биополимеров и был построен первый малоугловой рентгеновский дифрактометр с одномерным позиционно-чувствительным детектором [9]. Тогда же была опубликована пионерская работа по изучению бактериофага с использованием синхротронного излучения [10].

В 1986–1987 гг. в СССР и США вышла в свет монография Л.А. Фейгина и Д.И. Свергуна по рентгеновскому и нейтронному малоугловому рассеянию, которая до сего времени широко используется исследователями в данной области [11].

Важнейшим фактором развития МУР стали также новые методики анализа данных рассеяния и построения структурных моделей. Экспериментальные данные МУР позволяют напрямую определять общие характеристические параметры исследуемых систем, например средний размер частиц, их массу, анизотрию. Построение трехмерных моделей представляет собой сложнейшую задачу из-за ограниченного количества информации, содержащейся в данных рассеяния. В сравнении с рентгенограммами монокристаллов, где измеряются трехмерные наборы рефлексов, МУР дает картины рассеяния, усредненные по ориентациям, а для полидисперсных систем и по размерам рассеивающих объектов. Решение обратной задачи рассеяния, т.е. однозначное восстановление по экспериментальным данным трехмерной структуры объекта, в общем случае просто невозможно. Тем не менее в ряде работ 1970–80-х гг. (обзор которых дан в [11]) показано, что при определенных ограничениях трехмерные модели удается определять из данных рассеяния. Основной прогресс был достигнут в конце 1990-х гг., когда появились новые подходы к интерпретации данных МУР изотропными монодисперсными системами [11]. Эти подходы, реализованные в виде компьютерных программ, доступных всему научному сообществу, получили широкое применение для анализа данных МУР сначала от биологических систем, а затем и от таких небелковых объектов, как металлические наночастицы, примеры исследований которых даны в разд. 4.

В настоящей работе после краткого изложения основных принципов МУР изотропными дисперсными наносистемами дается обзор методов структурной интерпретации данных рассеяния, разработанных в сотрудничестве между Институтом кристаллографии РАН (ИК РАН) и Европейской молекулярно-биологической лабораторией (ЕМБЛ). Для иллюстрации эффективности этих методов и возможностей современного синхротронного МУР в разд. 3 и 4 рассмотрены недавние примеры исследования объектов различной природы.

1. ОСНОВЫ ТЕОРИИ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

1.1. Теоретические основы метода

В методе МУР, как правило, применяют излучение с длиной волны порядка одного ангстрема. Поскольку межатомные расстояния в конденса-

рованной фазе вещества имеют такой же порядок величины, то для исследования надатомной структуры оказывается достаточным регистрировать дифракционную картину в области малых углов рассеяния, откуда и получил название сам метод. Важнейшей особенностью МУР является возможность анализа внутреннего строения разупорядоченных систем. Зачастую его применение — единственный способ получения прямой структурной информации о системах с хаотическим распределением неоднородностей плотности.

Одной из основных концепций, используемых при анализе рассеяния разупорядоченными системами, является концепция “матрица—частица”. В большинстве практически важных приложений рассеивающий объект можно представить как совокупность частиц, внедренных в матрицу, причем рассеивающая способность частиц отличается от матрицы (частицы имеют контраст по отношению к матрице). Рассеивающая способность частиц для рентгеновских лучей описывается распределением электронной плотности $\rho(\mathbf{r})$. В предположении, что матрица имеет постоянную электронную плотность ρ_s , эффективная рассеивающая способность частицы дается разницей $\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) - \rho_s$. Амплитуда упругого рассеяния от одной частицы в матрице определяется преобразованием Фурье

$$A(\mathbf{s}) = \mathfrak{F}[\rho(\mathbf{r})] = \int_V \Delta\rho(\mathbf{r}) \exp(i\mathbf{s}\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (1)$$

где вектор рассеяния \mathbf{s} есть разность между волновыми векторами рассеянной \mathbf{k}_1 и падающей \mathbf{k}_0 волн (рис. 1). В эксперименте измеряется не амплитуда, а интенсивность рассеяния $I(\mathbf{s}) = A(\mathbf{s})A^*(\mathbf{s})$, пропорциональная числу фотонов, рассеянных в направлении \mathbf{s} .

В малоугловых исследованиях разупорядоченных объектов чрезвычайно важным является случай монодисперсной системы, когда все частицы идентичны, но имеют хаотическую ориентацию в образце. Классическим примером такой системы являются высокоочищенные растворы биологических макромолекул, где частицы (белки или их комплексы) производятся по общей генетической программе и имеют одинаковую конформацию. При исследовании разбавленных растворов эффектами межчастичной интерференции можно пренебречь, и кривая рентгеновского МУР после вычета рассеяния матрицей (в данном случае растворителем) отвечает рассеянию одной частицей, усредненному по всем ориентациям $I(\mathbf{s}) = \langle I(\mathbf{s}) \rangle_\Omega$, где Ω — телесный угол в обратном пространстве. По такой кривой изотропного рассеяния удается без привлечения априорной информации определять некоторые интегральные характеристики исследуемых частиц (так называемые инварианты).

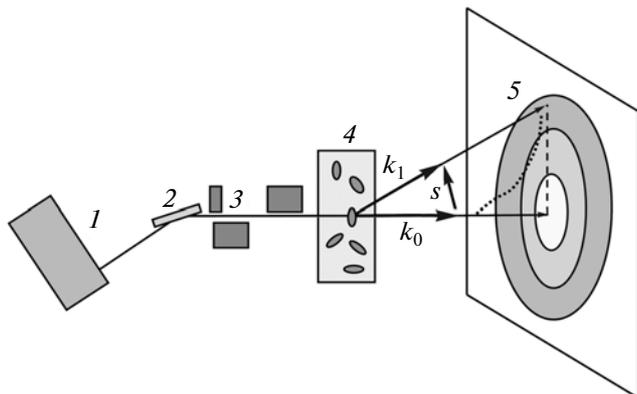


Рис. 1. Схема эксперимента по малоугловому рентгеновскому рассеянию: 1 – источник излучения (трубка); 2 – монохроматор; 3 – коллиматор; 4 – образец; 5 – двумерный или линейный (пунктир) детектор; k_0 – волновой вектор первичного пучка излучения, равный $2\pi/\lambda$; k_1 – волновой вектор рассеянного излучения; s – вектор рассеяния. Точками показан профиль интенсивности регистрируемого малоуглового рассеяния.

1.2. Инварианты и моделирование монодисперсных систем

Инвариантами называют структурные характеристики систем, которые могут быть в явном виде выражены через интенсивность МУР. Вычисление инвариантов при правильно проведенном эксперименте не требует никакой априорной информации о частицах в системе. Геометрические характеристики частиц можно определять из кривой рассеяния в относительных единицах, а расчет весовых параметров требует абсолютизации измерений.

Классическим параметром (который был впервые определен еще в основополагающей работе А. Гинье [12]) является радиус инерции частицы R_g . Этот параметр может быть найден по начальному участку кривой рассеяния (для малых значений s) с помощью формулы

$$I(s) = I(0)\exp(-s^2 R_g^2/3). \quad (2)$$

Из наклона прямолинейного участка зависимости $\ln I(s)$ от s^2 (графика Гинье) определяют величину R_g , которая характеризует средний размер частицы, а также интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$, которая пропорциональна квадрату молекулярной массы. Объем V и площадь поверхности S вычисляют с использованием нормированного инварианта Порода [13]:

$$Q_0 = \int_0^\infty i(s)s^2 ds, \quad i(s) = I(s)/I(0), \quad (3)$$

$$V = \frac{2\pi^2}{Q_0}, \quad \frac{S}{V} = \frac{\pi}{Q_0} \lim[s^4 i(s)], \quad s \rightarrow \infty. \quad (4)$$

Фурье-преобразование интенсивности рассеяния позволяет определить функцию распределения по расстояниям

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin sr}{sr} dr. \quad (5)$$

Эта функция помимо информации об анизотропии частицы позволяет оценивать максимальный размер D_{\max} из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\max}$. В практических исследованиях $p(r)$ рассчитывают не прямым интегрированием интенсивности (что приводит к сильным эффектам обрыва), а с помощью так называемого косвенного фурье-преобразования [11, 14].

Сферическое усреднение кривой интенсивности рассеяния, возникающее из-за хаотической ориентации частиц, приводит к значительной потере информации, содержащейся в дифракционных данных. Интерпретация одномерных данных рассеяния с использованием трехмерных моделей – чрезвычайно трудная задача. Традиционные методы анализа кривых МУР изотропными монодисперсными системами основывались на расчете инвариантов, а также включали простое моделирование путем аппроксимирования формы частицы трехпараметрическими геометрическими телами. Для построения более сложных моделей применяли метод проб и ошибок с использованием априорной информации о строении частиц, полученной другими методами (электронная микроскопия, различные физико-химические измерения). Как правило, строился ряд предполагаемых моделей исследуемых частиц и сравнение рассеяния на них с экспериментальной кривой. Этот подход иногда позволял подобрать модель, наилучшим образом отвечающую как данным рассеяния, так и априорной информации, но не говорил ничего о единственности решения.

1.3. Полидисперсные системы и смеси

Среди полидисперсных систем (т.е. систем неидентичных частиц) можно выделить два наиболее важных случая. В одном из них объект содержит несколько различных типов невзаимодействующих частиц с произвольной структурой. Интенсивность рассеяния от такой смеси может быть записана в виде линейной комбинации

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s), \quad (6)$$

где $v_k > 0$ и $I_k(s)$ – объемная доля и интенсивность рассеяния от k -го типа частиц (компонент) соот-

ветственно, а K – число компонентов. Ясно, что располагая только экспериментальными данными рассеяния от смеси, нельзя реконструировать структуры отдельных компонентов, и количество информации, которая может быть извлечена, зависит от дополнительной информации. Если число компонентов и их кривые рассеяния известны априори, можно определить объем фракций v_k в линейной комбинации (6) просто методом неотрицательных линейных наименьших квадратов [15]. Такие ситуации часто встречаются при анализе равновесных систем (растворы олигомерных белков, процессы сборки самоорганизующихся объектов, фазовые переходы в микроэмульсиях).

Другой тип полидисперсности характерен для систем, где частицы имеют схожие формы и различаются только размерами. Такие системы удобно описывать объемной функцией распределения $D(R) = N(R)V(R)$, где $N(R)$ – число частиц с характерным размером R в системе, а $V(R)$ – объем одной частицы данного размера. Интенсивность рассеяния в этом случае определяется интегралом

$$I(s) = (\Delta\rho)^2 \int_{R_{\min}}^{R_{\max}} D(R)V(R)i_0(sR)dR, \quad (7)$$

где $i_0(sR)$ – “форм-фактор”, т.е. нормированная интенсивность рассеяния частицей ($i_0(0) = I$), R_{\min} и R_{\max} – минимальный и максимальный размер частиц соответственно. Биологические объекты редко дают такой вид полидисперсности, но данное уравнение часто применяется к мицеллам, микроэмульсиям, блок-сополимерам, металлическим наночастицам и др. В большинстве практических случаев предполагается, что форм-фактор частицы известен (в частности, для изотропной системы частицы обычно можно считать сферическими). Тогда объемную функцию распределения функций $D(R)$ можно определить с помощью косвенного преобразования, аналогично тому, как решается интегральное уравнение (5).

В следующем разделе приведен обзор новых методов анализа данных МУР, развитых в последнее десятилетие. Эти методы позволяют определять трехмерные структуры частиц в монодисперсных (и даже умеренно полидисперсных) системах на разрешении до 1 нм. Также описываются эффективные приемы анализа полидисперсных смесей, дающие возможность количественного описания сложных объектов и процессов.

2. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СТРУКТУРНОЙ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ДАННЫХ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

2.1. Обратная задача рассеяния и сферические гармоники

В предыдущем разделе показано, что МУР, как и другие методы, основанные на упругом рассеянии, описывается с помощью математического аппарата фурье-преобразований. Однако для извлечения информации о трехмерной структуре исследуемых объектов в теории малоуглового рассеяния широко применяется аппарат описания малоугловой дифракции с помощью сферических гармоник.

Основным достоинством сферических гармоник является то, что сферическое усреднение дифракционной картины существенно упрощается при использовании мультипольного разложения. Действительно, рассмотрим рассеяние отдельно взятой частицей, состоящей из N атомов. Для атомных координат $\mathbf{r}_k = (r_k, \omega_k) = (r_k, \theta_k, \varphi_k)$, $k = 1, 2, \dots, N$ и соответствующих атомных форм-факторов $f_k(s)$ трехмерная амплитуда рассеяния:

$$A(\mathbf{s}) = \sum_{k=1}^N f_k(s) \exp(i\mathbf{s}\mathbf{r}_k). \quad (8)$$

Функцию $\exp(i\mathbf{s}\mathbf{r})$ можно представить в виде [16]:

$$\exp(i\mathbf{s}\mathbf{r}) = 4\pi \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l i^l j_l(sr) Y_{lm}^*(\omega) Y_{lm}(\Omega), \quad (9)$$

где $j_l(sr)$ – сферические функции Бесселя, а $Y_{lm}(\Omega)$ – сферические гармоники.

Таким образом, амплитуда рассеяния записывается в виде

$$A(\mathbf{s}) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l A_{lm}(s) Y_{lm}(\Omega), \quad (10)$$

где функции $A_{lm}(s)$ называют парциальными амплитудами:

$$A_{lm}(s) = 4\pi i^l \sum_{k=1}^N f_k(s) j_l(sr_k) Y_{lm}^*(\omega_k). \quad (11)$$

При возведении (11) в квадрат и сферическом усреднении по Ω благодаря ортогональным свойствам сферических гармоник все перекрестные члены исчезают, что приводит к простому выражению для интенсивности малоуглового рассеяния:

$$I(s) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l |A_{lm}(s)|^2, \quad (12)$$

где величина обрыва ряда L определяет разрешение представления структуры частицы.

Впервые это описание предложено Х. Штурманом [17, 18], и в настоящее время оно составляет базис для наиболее эффективных методик структурного анализа данных МУР.

Математический аппарат сферических гармоник оказался весьма эффективным и для параметризации структуры частицы в прямом пространстве. При этом можно параметризовать как распределение электронной плотности внутри частицы, так и ее форму в предположении, что частица однородна.

В первом случае рассеивающую плотность представляют в виде ряда

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \rho_{lm}(r) Y_{lm}(\omega) = \sum_{l=0}^{\infty} \rho_l(\mathbf{r}), \quad (13)$$

где $Y_{lm}(\omega)$ – сферические гармоники, ω – телесный угол в прямом пространстве, а $\rho_l(\mathbf{r})$ – парциальные мультипольные плотности. Функции $A_{lm}(s)$ и $\rho_{lm}(r)$ связаны преобразованием Ханкеля:

$$A_{lm}(s) = i^l \sqrt{2/\pi} \int_0^{\infty} \rho_{lm}(r) j_l(sr) r^2 dr, \quad (14)$$

$$\rho_{lm}(r) = (-i)^l \sqrt{2/\pi} \int_0^{\infty} A_{lm}(s) j_l(sr) s^2 ds, \quad (15)$$

и для расчета интенсивности используется выражение (12).

В [19] показан способ расчета распределения электронной плотности в аксиально-симметричных частицах, основанный на представлениях (12–15) при ограничении ряда (13) до некоторого значения $l = L$ и наложения ограничения на максимальный диаметр структуры, который является одним из инвариантов. В [20] показано, что при этих условиях решение обратной задачи единственно в случае сферически симметричных частиц, и метод применен к определению структуры бактериофага T7.

Во втором случае, если предполагать частицу однородной, с помощью сферических гармоник можно параметризовать форму ее оболочки $F(\omega)$, где каждому угловому направлению ставится в соответствие расстояние от центра до границы частицы. Распределение плотности внутри частицы

$$\rho(\mathbf{r}) = \begin{cases} 1, & 0 \leq r < F(\omega) - \Delta \\ F(\omega) - r/\Delta, & F(\omega) - \Delta < r \leq F(\omega) \\ 0, & r > F(\omega) \end{cases} \quad (16)$$

учитывает возможную размытость границ в реальных объектах (Δ – ширина переходного слоя

частица-матрица). Функция оболочки параметризуется с помощью сферических гармоник

$$F(\omega) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l f_{lm} Y_{lm}(\omega), \quad (17)$$

где f_{lm} – комплексные числа, а пространственное разрешение характеризуется параметром обрыва ряда L : $\delta r = \pi R_0 / (L + 1)$, где R_0 – радиус эквивалентной сферы. Структура частицы представляется таким образом с помощью $(L + 1)^2$ параметров, а для расчета модельной интенсивности рассеяния по формуле (12) используют выражение для парциальных амплитуд при заданной границе p_{\max} :

$$A_{lm}(s) = (is)^l (2/\pi)^{1/2} \times \sum_{p=0}^{p_{\max}} ((-1)^p f_{lm}^{l+2p+3} \{2^p p! (l+2p+3) [2(l+p)+1]!!\}^{-1} s^{2p}), \quad (18)$$

где $f_{lm}^{(q)} = \int_{\omega} [F(\omega)]^q Y_{lm}^*(\omega) d\omega$.

Использование математического аппарата сферических гармоник позволило создать ряд высокоэффективных алгоритмов и программ моделирования формы и строения низкого разрешения наночастиц в монодисперсных системах. Данные программы в настоящее время широко используются во всем мире [21].

2.2. Прямое восстановление формы

В случае однородных частиц аппарат описания малоугловой дифракции с помощью сферических гармоник, рассмотренный в предыдущем разделе, позволяет выписать в явном виде класс функций $\rho(\mathbf{r})$ (распределение рассеивающей плотности в частице), отвечающих данной функции $I(s)$. Методы поиска мультипольных составляющих рассеивающей плотности позволяют при наличии минимальной априорной информации реконструировать структуру частицы с относительно низким разрешением. Подход, использующий угловую функцию оболочки на основе сферических гармоник, к *ab initio* восстановлению формы низкого разрешения был развит в [22]. В этом методе функцию оболочки (17) восстанавливают, решая нелинейную задачу наименьших квадратов

$$\min_{f_{lm}} \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N [(I_{\text{exp}}(s_i) - qI(s_i)) W(s_i)]^2}{\sum_{i=1}^N [I_{\text{exp}}^2(s_i) W^2(s_i)]} + \sum_{k=1}^K g_k^2 W_k \right\}, \quad (19)$$

где $W(s)$ – весовая функция, ослабляющая относительный вклад в суммарную невязку начального участка кривой рассеяния и учитывающая

оценки экспериментальных ошибок $\sigma(s_j)$: $W(s_j) = s_j^2/\sigma(s_j)$, где $i = 1, \dots, N$, N – число точек в экспериментальной кривой рассеяния; q – вспомогательный МНК-множитель, совмещающий кривые перед вычислением разности, g_k – набор из K штрафных членов за отрицательность функции формы, уход центра тяжести тела из начала координат и за негладкость формы (в этом случае $K = 3$).

В конце 90-х гг. был разработан метод *ab initio* восстановления формы с использованием модели конечных объемных элементов. Поиск трехмерной формы частицы осуществляется с использованием эвристических методов глобальной минимизации, например моделирования отжига (*simulated annealing*) [23] или генетического алгоритма [24]. Алгоритм, основанный на поиске решения методом моделирования отжига, оказался исключительно эффективным из-за использования описанного выше аппарата сферических гармоник и ряда алгоритмических решений, в частности из-за отказа от вариации на каждом шаге поиска всех параметров модели, а варьировании только одного, выбираемого случайным образом. При этом экспериментальные данные рассеяния приближаются с наложением ограничений (компактность и неразрывность) на возможное решение.

Основная идея моделирования конечными элементами, впервые предложенного в [24], заключается в следующем. Область поиска (например, сфера с диаметром, равным максимальному размеру частицы D_{\max}) заполняется N ($\sim 10^3$) плотноупакованными шариками радиуса $r_0 \ll D_{\max}$. Каждому шару приписывается индекс X_j , обозначающий, к какой фазе принадлежит данный объемный элемент ($X_j = 0$ означает растворитель, $X_j = 1$ – частица). При фиксированных положениях шариков форма и структура модели конечных объемных элементов полностью описываются конфигурационным вектором X , содержащим $N \approx (D/r_0)^3$ компонент. В методе [23] интенсивность рассеяния такой моделью быстро рассчитывается с помощью приведенного выше мультипольного разложения (10–12). Техника моделирования отжига в данном случае заключается в старте с произвольной модели X_j и ее случайных модификаций до тех пор, пока модель не станет приближать данные. Более того, поскольку для *ab initio* определения формы используются данные рассеяния, соответствующие низкому разрешению, искомая модель также должна иметь низкое разрешение по отношению к r_0 . Поэтому на модель накладываются также условия связности и компактности, так что целевая функция, минимизируемая в процессе восстановления модели низкого разреше-

ния, имеет вид: $f(X) = \chi^2 + \alpha P(X)$. Здесь, χ^2 это невязка

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[\frac{I(s_j) - I_{\text{exp}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (20)$$

где $I_{\text{exp}}(s)$ – экспериментальная интенсивность, определенная в N точках s_j , $j = 1, \dots, N$, и $\sigma(s_j)$ соответствующие стандартные отклонения, а $P(X)$ – штраф за некомпактность модели ($\alpha > 0$ – его вес, задаваемый пользователем).

Этот подход в разных вариантах использован в ряде программ, находящихся в свободном доступе в Интернете (например, DALAI_GA, DAMMIN, DAMMIF, GASBOR и др.) [21, 24, 25].

На практике получаемые по одному и тому же набору данных рассеяния решения (структурные модели) отличаются друг от друга. Это связано с двумя причинами – неоднозначностью решения и его нестабильностью из-за плохой обусловленности задачи. Неоднозначность проявляется в произвольной ориентации и неразличимости энантиоморфных структур. Кроме того, теоретически возможно существование разных структур, не приводимых друг к другу операциями симметрии и имеющих одинаковые функции распределений по расстояниям, что соответствует одинаковым модельным кривым рассеяния. Однако эта неоднозначность не является фатальной для методов, так как такие структуры имеют одинаковый набор инвариантов (разд. 1.2) и, отличаясь в деталях, сохраняют общую форму частиц. Неустойчивость решения также проявляется в различиях на уровне высокого разрешения между независимо рассчитанными моделями.

В [26] приведены результаты численных экспериментов по восстановлению формы частиц, описываемых геометрическими телами с различной анизотрией. Форма восстанавливалась по теоретическим кривым рассеяния, взятых в качестве экспериментальных. Наименьший разброс имеют решения для глобулярных и вытянутых частиц, тогда как однозначное восстановление плоских структур с отношением диаметр/толщина более 5 невозможно без привлечения дополнительной информации (например, учета элементов симметрии формы). Использование аналитических выражений для специальных форм-факторов, разработка которых продолжается до настоящего времени [27], также позволяет повысить устойчивость моделей.

Для оценки устойчивости решений и нахождения наиболее вероятной модели разработан ряд программ. Программа SUPCOMB [28] позволяет проводить автоматическое совмещение объектов, минимизируя степень различия между двумя моделями, представленными наборами точек (центрами шариков или узлами сетки, описывающей

форму частиц). Критерием различия является нормализованное пространственное отклонение (NSD), рассчитываемое следующим образом: от каждой точки в первой модели определяются расстояния до каждой точки во второй модели и находятся их минимальные значения. Затем эта процедура выполняется для каждой точки второй модели относительно первой, и все полученные величины суммируются и нормируются на средние расстояния между соседними точками в каждой модели. Для похожих структур NSD принимает значения меньше единицы. Программа DAMAVER [26] использует SUPCOMB для оптимального перекрестного совмещения нескольких (обычно не менее 10) независимо рассчитанных по одному и тому же набору данных моделей, после чего проводит их суммирование, подсчитывая число попаданий структур в соответствующие ячейки области поиска. Все полученные заселенные ячейки образуют структуру, которая представляет собой область разброса решений, из которой выделяется часть, представленная ячейками с наибольшими числами попаданий, и имеющую объем, соответствующий инварианту (4). Полученная структура, представленная шариковой моделью, уточняется в процессе нового поиска, осуществляемого внутри области разброса.

В настоящее время определение формы частиц по данным МУР – стандартная процедура, и на некоторых синхротронных линиях (например на станции ЕМБЛ Х33 на синхротроне DESY) пользователи получают форму автоматически, в режиме реального времени, спустя ~2 мин после самого измерения. Примеры использования этих методов для анализа биологических макромолекул и наночастиц приводятся в разд. 4.

2.3. Метод молекулярной тектоники

Другим чрезвычайно важным подходом для интерпретации данных МУР трехмерными моделями является моделирование жесткими телами, или метод молекулярной тектоники. Он получил свое развитие, прежде всего, в биологических исследованиях, где современные проекты “структурной геномики” позволяют определять тысячи структур индивидуальных макромолекул и их фрагментов с помощью рентгеновского анализа и ЯМР [29–31].

Однако самые важные клеточные функции белков совершаются не отдельными белками, а макромолекулярными комплексами. Такие комплексы обычно слишком велики для исследования методом ЯМР и, кроме того, они часто обладают внутренней структурной гибкостью, затрудняя тем самым их кристаллизацию. Поэтому необходимы альтернативные экспериментальные методики и подходы при анализе данных для ана-

лиза макромолекулярных ансамблей, и МУР предоставляет такие возможности.

Кривые рассеяния растворов чувствительны к изменениям четвертичной структуры макромолекул. Таким образом, этот метод оказывается чрезвычайно полезным для анализа макромолекулярных комплексов. Подробные модели могут быть построены в случае, когда известны с высоким разрешением структуры отдельных доменов или субъединиц, составляющих комплекс [32].

Суть алгоритма молекулярной тектоники легко иллюстрируется на примере комплекса, состоящего из двух субъединиц (A и B). Амплитуды рассеяния от субъединиц, расположенных в центре с соответствующей ориентацией, обозначим как $A(s)$ и $B(s)$ соответственно. Произвольный комплекс может быть образован фиксированной первой субъединицей и вращающейся и двигающейся второй субъединицей. Вращение описывается углами Эйлера α , β и γ , а сдвиг вектором $\mathbf{u} = (u_x, u_y, u_z)$, так что вся операция описывается шестью параметрами.

Обозначим через $C(s)$ амплитуду рассеяния от смещенной второй субъединицы, тогда рассеяние от комплекса может быть выражено как

$$I(s) = I_A(s) + I_B(s) + 2\langle A(s)C^*(s) \rangle_{\Omega}. \quad (21)$$

Используя разложение (8–12) и учитывая ортогональные свойства сферических гармоник, уравнение (21) можно свести к следующему выражению:

$$I(s) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \{ |A_{lm}(s)|^2 + |B_{lm}(s)|^2 + 2 \operatorname{Re}[A_{lm}(s)C_{lm}^*(s)] \}. \quad (22)$$

При условии, что структуры субъединиц известны, можно вычислить амплитуды рассеяния и парциальные функции $A_{lm}(s)$ и $B_{lm}(s)$ из атомных моделей, как показано в [32, 33]. Парциальные функции $C_{lm}(s)$ вращающейся и сдвинутой второй субъединицы выражаются аналитически:

$$C_{lm}(s) = \sum_{k=-l}^l D_{mk}^l(\alpha, \beta, \gamma) C_{lk}^0(s, \mathbf{u}), \quad (23)$$

где $D_{mk}^l(\alpha, \beta, \gamma)$ – элементы матрицы конечных вращений.

Таким образом, моделирование жесткими телами заключается в определении шести параметров второй субъединицы, минимизирующей невязку (20) между экспериментальной и расчетной кривой рассеяния. Этот принцип легко обобщается на случай большего числа субъединиц, а также для симметричных частиц (в последнем случае достаточно уточнять расположение субъединиц в анизометрической части комплекса).

Метод молекулярной тектоники получил в настоящее время широкое распространение для анализа строения биологических комплексов и макромолекулярных машин (например, обзор [29]). Интересно, что и его наряду с определением формы оказывается возможным применять для трехмерного моделирования наночастичных систем (примеры в следующих разделах).

3. РЕНТГЕНОВСКИЕ ИСТОЧНИКИ И УСТАНОВКИ ДЛЯ МАЛОУГЛОВОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

3.1. Традиционные установки для малоуглового рассеяния

Отличительной особенностью лабораторных малоугловых дифрактометров является возможность измерений рентгеновского рассеяния, начиная с очень малых углов (десятых долей градуса). В качестве источника излучения используют рентгеновские трубки как обычной конструкции, так и с вращающимся анодом, которые позволяют получать пучок достаточно высокой интенсивности. Недостатком трубок является необходимость использования характеристических линий излучения материала анода, что не дает возможности оперативно изменять длину волны. На рис. 1 приведена принципиальная схема установки малоуглового рассеяния, которая отличается от классических монокристалльных и порошковых дифрактометров только схемой коллиматора, позволяющего получать штриховой пучок с очень малой шириной (как правило, используют узел блочного коллиматора по схеме Кратки [13]). Малая ширина пучка приводит к необходимости использования его большой высоты — до 10–30 мм, что связано с необходимостью получения достаточного потока квантов через слаборассеивающий образец. Это в свою очередь приводит к необходимости учета коллимационных искажений и приведения картины рассеяния к точечному пучку. Алгоритмы введения коллимационных поправок достаточно широко освещены в литературе, их обзор приведен в [11]. В универсальных дифрактометрах для измерения малоуглового рассеяния при использовании пучка с точечной коллимацией применяют большие, до нескольких метров, расстояния образец–детектор. При использовании в качестве источника вращающегося анода на таких установках можно не только снимать кривые малоуглового рассеяния с приемлемым отношением сигнал/шум, но и проводить малоугловые исследования поверхностей при скользющем падении пучка (*grazing incidence small-angle scattering*, **GISAXS**). В последние годы появился новый тип рентгеновских трубок, обладающих рядом серьезных преимуществ. Это так

называемые микрофокусные источники, совмещающие трубку с малым током электронного пучка (потребляемая мощность 30–60 Вт) и фокусирующее зеркало с многослойным покрытием, которое одновременно является и монохроматором. На таких установках можно работать при высокой яркости точечного пучка, сравнимой с источниками с вращающимся анодом. Но, конечно, лабораторные установки существенно (в среднем на 3–4 порядка величины) уступают по интенсивности и яркости синхротронным станциям, рассмотренным ниже.

3.2. Некоторые характеристики синхротронного малоуглового эксперимента

Преимущества СИ [34] по сравнению с излучением рентгеновских трубок определяется неизмеримо более высокой интенсивностью непрерывного рентгеновского спектра, направленностью пучка и отсутствием в СИ характеристических линий. В рентгеновских трубках электроны, летящие со скоростью порядка 10^4 м/с, резко тормозятся в тонком слое металла, и практически вся их энергия превращается в тепло, что и ограничивает мощность рентгеновского пучка. На синхротронах коротковолновое электромагнитное излучение возникает при ускоренном движении электрона с релятивистской скоростью (угловое ускорение достигается поворотными магнитами или на линейных участках — виглерами/ондуляторами). СИ обладает рядом важнейших для структурных приложений свойств, и для МУР используется, прежде всего, огромная яркость, т.е. высокая интенсивность, малый размер и малая угловая расходимость пучка. Область длин волн в синхротронных источниках охватывает интервал от жесткого рентгеновского до ультрафиолетового излучения. Широкий спектральный интервал СИ находит свое применение для экспериментов с использованием аномального рентгеновского рассеяния, где с помощью вариации длины волны вблизи края поглощения атомами определенного типа удается выделить сигнал от этих атомов [35]. Периодическое прерывание пучка во времени, возникающее из-за пакетной структуры электронов, вращающихся в накопителе, также оказывается полезным для кинетических МУР экспериментов с высоким временным разрешением [36].

Как правило, синхротронный МУР эксперимент занимает очень короткое время. В зависимости от типа СИ кольца типичное время экспозиции составляет порядка минуты (для станций на поворотных магнитах) или доли секунды (для ондуляторных установок). Эти времена несравнимы с рентгеновскими камерами, где время эксперимента измеряется многими минутами и доходит даже до часов (на установках с точечной геометрией пучка). Размер пучка на современных

синхротронных станциях составляет, как правило, десятки микрон, но специализированные установки позволяют достигать субмикронных размеров [37]. Таким образом, объем образца, необходимый для МУР с применением СИ, составляет обычно меньше 50 μl , но может быть и менее 10 μl , что чрезвычайно важно для биологических исследований, где получение очищенных препаратов является очень сложной процедурой и доступное количество образца, как правило, измеряется в микро- или миллиграммах.

Как говорят, недостатки есть продолжение достоинств. Для синхротронного МУР его важнейшее достоинство — огромная яркость пучка — является также недостатком, поскольку приводит к радиационным повреждениям образца. Этот эффект особенно критичен при исследовании биологических материалов. В белковой кристаллографии с применением СИ радиационные повреждения могут быть существенно уменьшены заморозкой кристалла, тогда как исследования МУР на биологических растворах происходят выше точки замерзания воды, что позволяет их исследовать в условиях, близких к естественным. Поэтому для уменьшения радиационных повреждений в раствор добавляют поглотители свободных радикалов, и/или выполняют измерения в ячейках, где образец протекает через облученный объем во время измерения [38]. Последнее несколько увеличивает количество материала, требуемое для эксперимента, но позволяет практически полностью избежать радиационных повреждений.

3.3. Синхротронные малоугловые дифрактометры

В настоящее время все важнейшие синхротроны в мире имеют одну или несколько станций, либо целиком выделенных для МУР, либо делящих МУР приложения с другими методами (кристаллографией или дифракцией на волокнах). Среди наиболее известных можно перечислить ондуляторные станции с высокой яркостью ID01, ID02, ID09, ID13 ID14-3 на синхротроне ESRF (Гренобль, Франция), 8-ID, 12-ID, 15-ID 18-ID на источнике APS в Аргонской национальной лаборатории (США), BL 4-2 (SSRL, Стэнфордский университет, США), BL45XU на синхротроне Spring-8, Химеджи, Япония. Выделенные малоугловые станции построены на недавно введенных в эксплуатацию синхротронах Diamond в Англии (линия I22) и Soleil во Франции (линия SWING). Находится в стадии тестирования биологическая малоугловая станция BioSAXS, которую вводит в эксплуатацию ЕМБЛ на синхротронном кольце Petra-3. В России малоугловые станции имеются на синхротроне ВЭПП-3 (канал 5б, станция ФРАКС) и на синхротроне Сибирь-2 Курчатовского РНЦ (две станции на линии К1-3). Практи-

чески все установки МУР на синхротронах принадлежат наиболее популярным станциям, пользующимся широким спросом у пользователей.

Синхротронные станции, как правило, обеспечивают монохроматический пучок рентгеновского излучения, сфокусированный на детекторе в горизонтальном и вертикальном направлениях. В отличие от кристаллографических дифрактометров, где фокусирующие элементы располагают как можно ближе к образцу, чтобы достигнуть минимального размера фокуса, малоугловые установки конструируются в пропорции, близкой к 1:1, чтобы не ухудшать расходимость пучка. Излучение фокусируется на детекторе, который расположен достаточно далеко (несколько метров) от образца, чтобы регистрировать самые малые углы рассеяния. На рис. 2 изображена схема МУР станции X33, построенной ЕМБЛ на накопительном кольце DORIS-3 синхротрона DESY в Гамбурге. Источник (позиция поворотного магнита), обозначенный цифрой (1), находится более чем в 20 м от оптической системы. Пучок монохроматизируется и горизонтально фокусируется изогнутым кремниевым кристаллом (2). Гравиметрическое зеркало с родиевым покрытием (3) вертикально фокусирует пучок и отсекает высокие гармоники после прохождения кристалла-монохроматора. В общей сложности пять пар щелей используются для формирования пучка и отсека паразитного рассеяния, и четыре монитора позволяют следить за первичным, монохроматизированным, сфокусированным и прошедшим пучком. Весь путь прохождения пучка, включая камеру держателя образца (4) и трубу рассеянного излучения (5), вакуумирован для уменьшения поглощения и паразитного фона. Рассеянные фотоны одновременно регистрируются малоугловым (6) и широкоугловым (7) детектором, которые обеспечивают диапазон углов рассеяния от 0.1° до 25° . При длине волны в 0.15 нм, которая вырезается монохроматором, эти углы отвечают динамическому диапазону разрешения от 100 до 0.4 нм. Такой диапазон достаточен для исследования самых разнообразных объектов без изменения расстояния образец — детектор и перефокусировки станции. Эта установка была полностью переоборудована в течение последних лет [39] и оснащена, в частности, роботом для автоматических измерений рассеяния растворами [40] и двумя новейшими пиксельными детекторами фирмы DECTRIS, Pilatus-1M для малых углов и Pilatus-300kW для больших углов рассеяния.

Малоугловые ондуляторные установки на источниках третьего поколения имеют сходные оптические схемы с той, что изображена на рис. 2. На новейших станциях, как правило, монохроматизация осуществляется двойным плоским кристаллом-монохроматором с фиксированным направлением выхода пучка, что позволяет менять

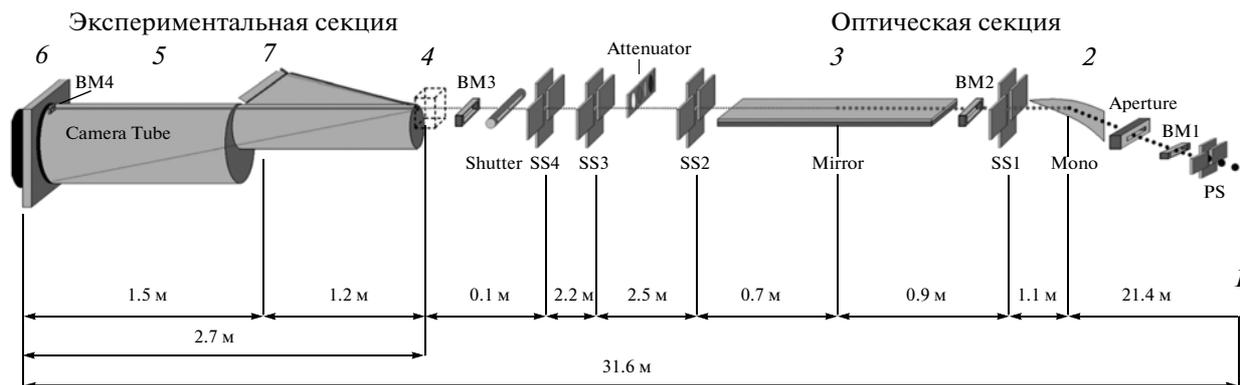


Рис. 2. Схема малоугловой установки X33 (ЕМБЛ, накопительное кольцо DORIS-3, синхротрон DESY, Гамбург). PS и SS1-4 обозначают щелевые системы, BM – мониторы интенсивности пучка.

длину волны (например, для экспериментов по аномальному рассеянию) без необходимости перестройки станции [37]. Фокусировка пучка осуществляется парой эллиптически изогнутых так называемых Киркпатрик-Баез зеркал в горизонтальном и вертикальном направлениях. На некоторых синхротронных станциях уже используется нанофокусирующая оптика с применением рефрактивных рентгеновских линз [41].

4. СТРУКТУРНЫЕ ПРИЛОЖЕНИЯ СОВРЕМЕННОГО МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ

Как указывалось в начале статьи, первые работы по рентгеновскому МУР были выполнены А. Гинье на металлических сплавах. Сейчас метод широко применяется для структурного анализа самых разнообразных слабоупорядоченных наноструктурных объектов, включая полимеры, сплавы, пористые и композитные материалы, наночастицы, растворы коллоидных частиц и биологических макромолекул. Настоящий раздел посвящен двум областям структурных приложений МУР, где, пожалуй, наиболее рельефно проявился прогресс в малоугловом эксперименте (прежде всего, яркие синхротронные источники) и новейшие теоретические разработки (методики интерпретации данных рассеяния). Эти два направления – анализ строения биологических макромолекул в растворе и структурные исследования синтезированных металлических наночастиц в полимерных и водных носителях.

4.1. Исследования биологических макромолекул и комплексов в растворе

Начиная с 1950–60-х гг., рентгеновское МУР стало использоваться для исследования биологических макромолекул в растворе как альтернатива белковой кристаллографии в отсутствие кристаллов. В то время определять удавалось только

общие параметры (такие, как радиус инерции R_g), а трехмерные модели строились методом проб и ошибок. В 1970–80-х гг. биологи перестали удовлетворяться таким ограниченным набором информации из данных рассеяния, что привело к заметному падению интереса к методике рентгеновского МУР. Ситуация изменилась коренным образом в 1990-е гг., когда стали широко доступны малоугловые синхротронные станции, позволившие измерять высокоточные кривые МУР на ограниченном количестве материала, и были развиты принципиально новые подходы к анализу данных, позволившие определять из этих кривых надежные трехмерные макромолекулярные модели.

4.1.1. Первые применения прямых методов анализа. Возможности восстановления структуры низкого разрешения по данным МУР были проанализированы Х. Штурманом [17, 18]. В этих работах введен в употребление математический аппарат сферических гармоник, который лежит в основе современных методов решения обратной задачи рассеяния (разд. 2.1). Уже первые приложения сферических гармоник показали высокую эффективность этого подхода. Ярким примером потенциала МУР для определения детальных моделей биологических макромолекул является работа по анализу структуры бактериального вируса T7. Этот большой бактериофаг с молекулярной массой около 55 МДа состоит из икосаэдрической белковой оболочки радиусом около 26 нм, содержащей двухцепочечную молекулу ДНК, и имеет цилиндрический хвостовой отросток. В [42, 43] был предложен итеративный метод восстановления парциальных амплитуд (13), описывающих трехмерную структуру тела в аксиально-симметричном приближении, и этот метод был применен для анализа структуры фага T7. Кривая рассеяния МУР бактериофагом была хорошо приближена с разрешением около 2.5 нм моделью, приведенной на рис. 3а, которая показала не

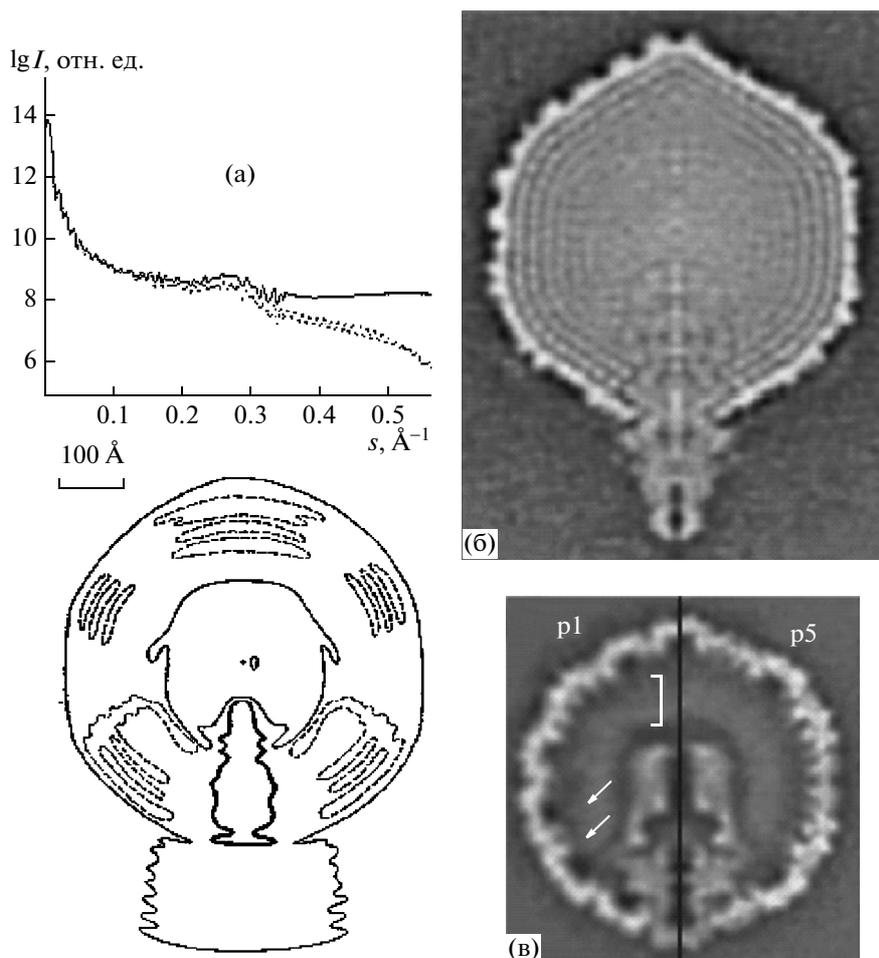


Рис. 3. Анализ структуры бактериального вируса Т7. Панель (а): данные рентгеновского МУР (верхняя панель; сплошная кривая — эксперимент, пунктирная кривая — рассеяние моделью) и контуры восстановленной плотности фаговой частицы [42, 43]. Панели (б) и (в): структура целой частицы и фагового про-капсида соответственно по данным крио-ЭМ [44].

только общую форму, но и детали внутренней структуры. Наиболее интригующим и неожиданным с биологической точки зрения в этой модели было ядро с радиусом около 13 нм, предположительно состоящее из белков, и цилиндрическая область повышенной электронной плотности в нижней части вируса, предположительно — плотноупакованная ДНК. В то время эти результаты не могли быть перепроверены и сопоставлены с другими, независимыми исследованиями — других методов, способных дать аналогичную информацию, просто не существовало. Однако 25 лет спустя в [44] было опубликовано исследование этого же бактериального вируса Т7 на двух стадиях его сборки, а именно: не только зрелых фаговых частиц (рис. 3б), но и белкового капсида, не содержащего ДНК (рис. 3в). Новые крио-ЭМ модели отлично согласуются с картой плотности, полученной прямой интерпретацией данных МУР, и подтверждают, в частности, наличие и общую форму белкового ядра в центральной части

фаговой частицы. Безусловно, детальные модели, построенные на основе результатов современной крио-ЭМ-реконструкции в [44], дают важнейшую информацию для понимания макромолекулярных взаимодействий, которые происходят во время сборки вируса и его созревания, но не следует забывать, что карта плотности фага Т7 была получена напрямую из данных МУР 30 лет назад.

Дальнейшее развитие прямых методов восстановления формы частиц связано с использованием рассмотренной в разд. 2.1.—2.2. угловой функции оболочки. Этот подход, реализованный в виде компьютерных программ, доступных для общего пользования [22, 45], позволил впервые систематически продемонстрировать, что трехмерные формы низкого разрешения действительно можно восстанавливать из данных рассеяния. Это было показано как на многочисленных тестовых примерах, так и практическим восстановлением формы белков с известной кристаллической структурой [22]. На рис. 4 приведено сравнение

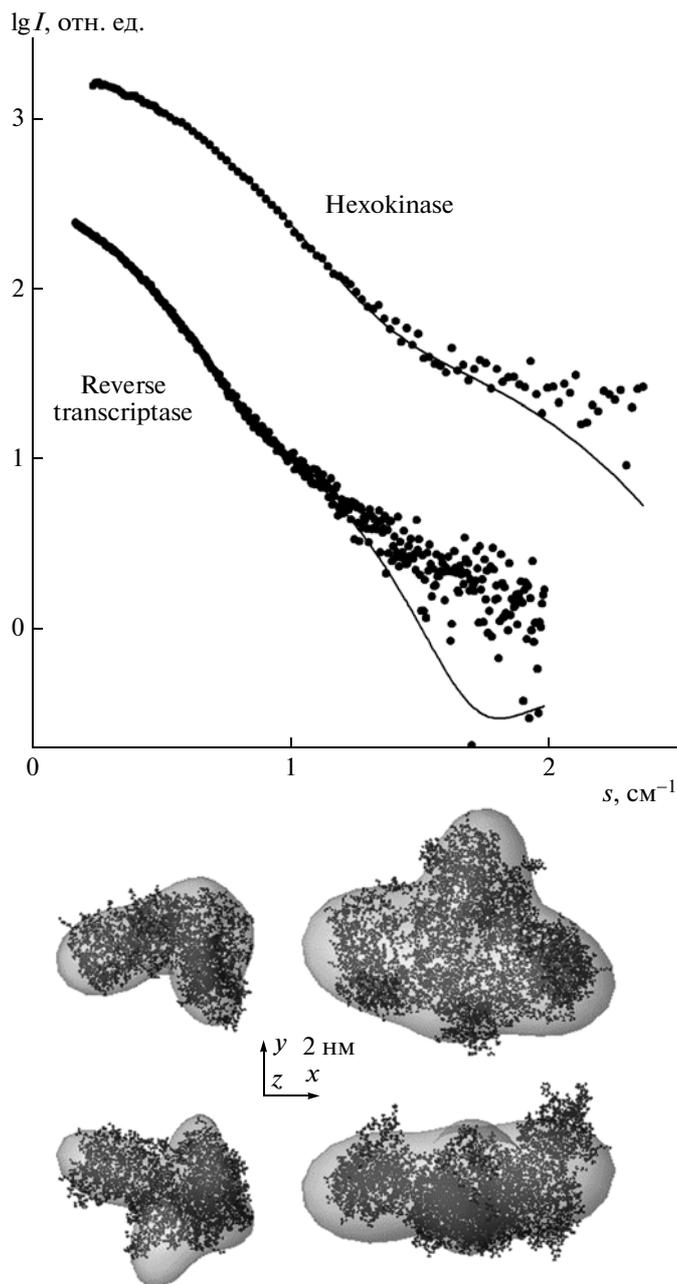


Рис. 4. Примеры восстановления функции оболочки для белков с известной кристаллической структурой. Верхняя панель, кривые МУР (точками даны экспериментальные данные, сплошные линии — кривая, рассчитанная из восстановленной модели). Нижняя панель, сравнение кристаллографических моделей (атомы показаны шариками) с формами, восстановленными МУР (полупрозрачные оболочки; слева, гексокиназа, справа обратная транскриптаза).

функции оболочки белков гексокиназы и обратной транскриптазы, восстановленных из экспериментальных данных рассеяния, с их структурой в кристалле. Видно, что модели МУР позволяют неплохо восстанавливать общую форму частиц на низком разрешении.

4.1.2. Определение формы как основной инструмент малоуглового рассеяния в биологии. Алгоритмы восстановления функции оболочки сыграли

огромную роль в становлении МУР как надежного метода определения трехмерной структуры. Пришедшие им на смену подходы, которые используют представление модели с помощью конечных элементов (виртуальных атомов или виртуальных остатков), позволяют восстанавливать существенно более детальные модели формы с разрешением до 1–1.5 нм. В настоящее время определение формы по данным МУР стало рутинной операцией, как и определение инвариан-

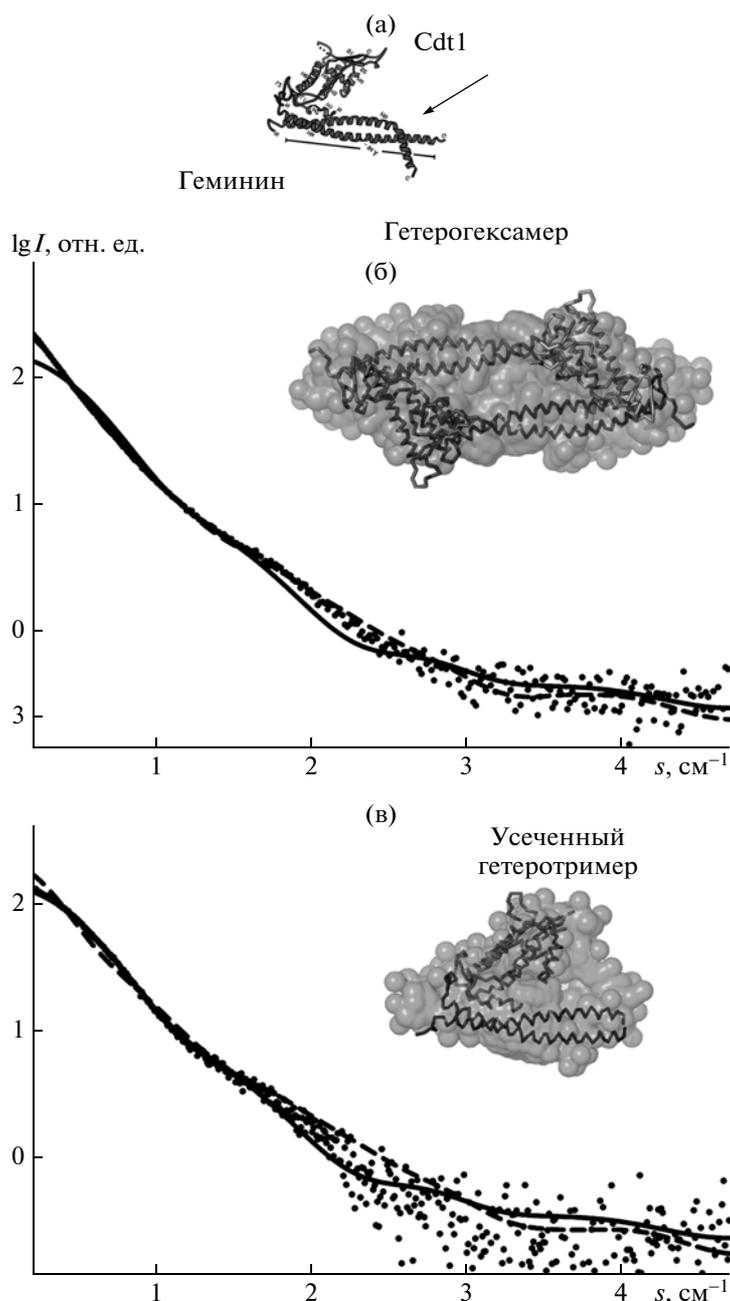


Рис. 5. Структура комплекса Cdt1-геминин: а – кристаллографическая гетеротримерная модель [47]. Изогнутая концевая часть одной из α -спиралей геминина отмечена стрелкой; б и в – модели, полученные совместным использованием кристаллографии и МУР [48] для полного комплекса (гетерогексамер) и комплекса с усеченным геминином (гетеротример). Малоугловые формы показаны полупрозрачными оболочками, кристаллографические модели – как цепи C_{α} атомов. На обоих панелях точки – экспериментальные данные, пунктир – кривая, рассчитанная из атомной модели гетерогексамера, сплошная линия – кривая, рассчитанная из атомной модели гетеротримера.

тов 20 лет назад, и подавляющее большинство публикаций содержат *ab initio* модели низкого разрешения. При этом восстановленные формы частиц позволяют делать важнейшие выводы об их структурной организации и функциональности. Одним из примеров такого анализа является определение четвертичной структуры белковых комплексов, связанных с ограничением возмож-

ности повторной репликации (ре-репликации) ДНК. Репликация – это процесс синтеза дочерней молекулы ДНК на матрице родительской молекулы, при котором генетический материал, зашифрованный в ДНК, удваивается и в процессе последующего деления делится между дочерними клетками. Репликация ДНК, которая включает в себя расплетение ее двойной спирали, осуществ-

ляется сложным ферментным комплексом из 15–20 различных белков. Процесс повторной репликации на определенной стадии развития клетки приводит к искусственному усилению отдельных генов и возможным раковым перерождениям. Этот процесс предотвращается в клетках с помощью очень интересного механизма [46]. Белки, ответственные за образование так называемых пре-репликативных комплексов (которые во взаимодействии с хроматином и обеспечивают репликацию), связываются с другими белками, и таким образом пре-репликативные комплексы больше не образуются. Один из ключевых белков в пре-репликативных комплексах — Cdt1 — связывается с белком под названием геминин, и понимание механизма их комплексообразования существенно для описания всего процесса предотвращения ре-репликации.

Кристаллическая структура комплекса Cdt1-геминин, опубликованная в 2004 г. [47], показала одну молекулу Cdt1, связанную с димером геминина (рис. 5а). Однако эта структура не давала однозначного ответа на вопрос, почему связывание с геминином может препятствовать образованию пре-репликативных комплексов. В [48] был предпринят анализ комплексов Cdt1-геминин с помощью кристаллографии и МУР. Восстановленная по данным рассеяния форма этого комплекса (рис. 5б) существенно отличалась от ранее опубликованной гетеротримерной структуры [43] и отлично согласовалась с гетерогексамерной моделью комплекса, независимо полученной с помощью кристаллографии (рис. 5б). Крайне интересным являлся тот факт, что в отличие от структуры [43] концевая часть геминина оставалась прямолинейной и обеспечивала формирование димера из гетеротримеров. Для дальнейшей проверки гетерогексамерной модели концевая часть геминина была удалена генетически, и МУР на таком урезанном комплексе дало форму частицы, полностью совместимую с урезанным гетеротримером (рис. 5в). Это подтверждает, что концевая часть спирали геминина действительно прямолинейна и отвечает за димеризацию гетеротримеров. В дополнение к определению формы олигомерный состав и структура комплекса в данном случае могут быть также проверены прямым сравнением невязки χ для расчетного рассеяния кристаллографическими моделями (что можно сделать, например, программой CRY SOL [49]) с экспериментальными данными. Такое сравнение также показывает, что полный комплекс является гетерогексамером, а комплекс с урезанным геминином — тримером. Таким образом, гетерогексамерный комплекс является основной формой ассоциации Cdt1 с геминином в растворе, что и объясняет блокировку геминином формирования пре-репликативных комплексов: Cdt1, связан-

ный в такие гетерогексамеры, не способен к взаимодействию с необходимыми для этого белками.

4.1.3. Молекулярная тектоника и совместное использование МУР с другими методами. Предыдущий пример наглядно показывает не только важность структурной информации, которую дает МУР, но и эффективность использования метода совместно с другими методиками. К таким методикам принадлежат кристаллография, ЯМР, крио-ЕМ, биохимические приемы, например генетические мутации белков, а также использование биоинформатики. Преимущества такого мультидисциплинарного подхода хорошо иллюстрируются работой по изучению комплексов фратаксина [50]. Точная функция этого белка пока неизвестна, но снижение его уровня приводит к нейродегенеративным патологиям в организме. Фратаксин взаимодействует с двумя основными компонентами железо-серных кластеров в клетках, десульфазой (Nfs1/IscS) и адапторным белком IscU. Структурные характеристики взаимодействия бактериального ортолога фратаксина (CyaY) с комплексом IscS/IscU исследованы в [50] с помощью ряда биофизических, биохимических и структурных методов. Были получены кривые МУР от индивидуальных белков, а также соответствующих бинарных и тройного комплекса (рис. 6). Моделирование рассеяния индивидуальными белками показало, что CyaY и IscU мономерны, а IscS — димер, а также позволило определить и уточнить структуры высокого разрешения этих белков, которые использовались для дальнейшего моделирования комплексов. Методом молекулярной тектоники получена модель тройного комплекса CyaY/IscS/IscU (рис. 6), причем расположение белков в комплексе одновременно согласовалось и рассеянием бинарными комплексами CyaY/IscS и /IscS/IscU. Более того, контакты между субчастицами в модели на рис. 6 были проверены с помощью мутаций аминокислотных остатков, ответственных за это взаимодействие, а также анализом возмущений в спектрах ЯМР. Таким образом, полученная методом молекулярной тектоники модель, хотя и основывается на данных МУР, т.е. низкого разрешения, подтверждена независимыми методами, имеет высокую достоверность и проливает свет на регулируемую функцию фратаксина по отношению к десульфазе (IscS).

Новые методы анализа данных принципиальным образом изменили роль МУР в структурных исследованиях биологических макромолекул в растворе. Более того, эти методы оказались применимы и для анализа небиологических наноструктурированных систем, примеры таких приложений можно найти в следующем разделе.

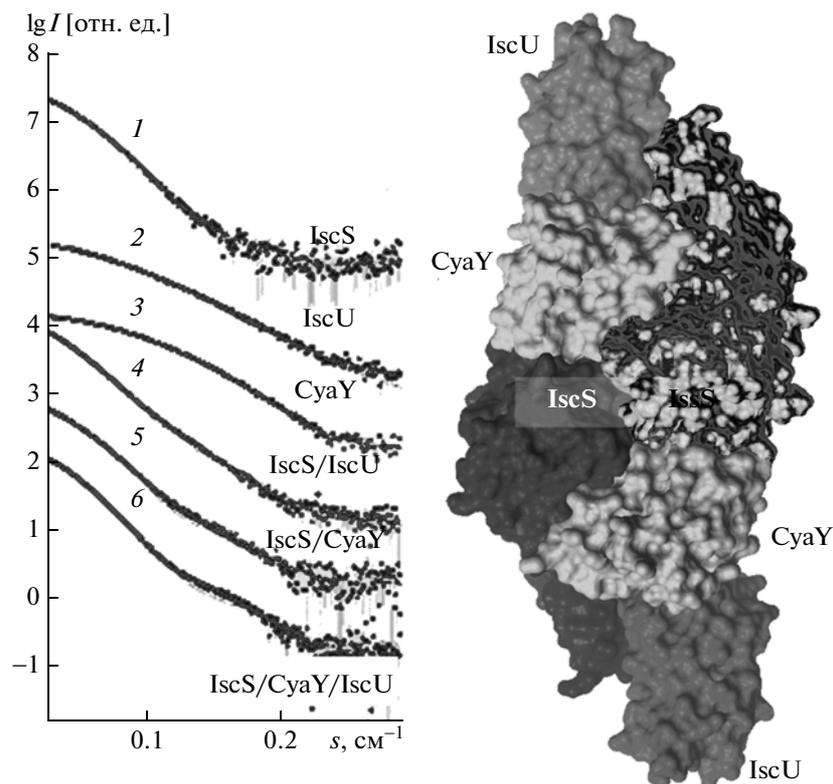


Рис. 6. Моделирование комплекса фратаксина (CyaY) с белками IscS и IscU. Экспериментальные кривые рассеяния индивидуальными белками, бинарными и тройным комплексом (точки) приведены вместе с расчетными кривыми от соответствующих моделей. В модели третичного комплекса отдельные белки показаны разными оттенками серого цвета.

4.2. Исследование полимерных нанокомпозитов

Наноразмерные металлические частицы демонстрируют необычные физические и химические свойства, что связано с так называемым квантовым размерным эффектом, который проявляется при переходе от макроскопических тел к размерам в несколько тысяч или даже сотен атомов [51]. При этом наночастицы металлов проявляют высокую реакционную способность, повышенную склонность к ионному и атомному обмену, адсорбции на различных поверхностях, к образованию поверхностных связей с другими адсорбирующимися частицами и т.д. Это открывает широкие возможности для создания новых эффективных катализаторов, сенсорных систем, композиционных материалов для лазерной физики и оптоэлектроники, препаратов с высокой биологической активностью для применения в экологии, биологии, медицине и сельском хозяйстве. Однако высокая реакционная способность металлических наночастиц является причиной их малого времени жизни — они легко агрегируют, а также вступают в реакции с другими химическими соединениями. Поэтому одной из важнейших проблем является формирование стабильных наночастиц заданного размера, в течение длитель-

ного времени сохраняющих свои уникальные свойства.

Существуют два принципиально разных подхода к решению этой проблемы — получение наночастиц, поверхность которых покрыта специальным защитным слоем, или стабилизация наночастиц в матрицах. В наших работах МУР использовалось для исследования металлических наночастиц, полученных и тем и другим способом.

Выбор метода исследования чрезвычайно важен для объективной оценки свойств изучаемых образцов. В этом отношении МУР, как уже отмечалось выше, имеет ряд существенных преимуществ даже перед такими современными и информативно-емкими методами, как электронная и сканирующая зондовая микроскопия. Важной особенностью метода является отсутствие специальной подготовки (замораживания, высушивания, осаждения и т.д.) вещества для исследования, что позволяет избежать нежелательного воздействия на структуру изучаемых образцов. Другим достоинством МУР является возможность анализировать строение вещества одновременно на разных структурных уровнях. Информация о форме и размере рассеивающих

объектов содержится в начальной части кривой — в области центрального рассеяния, а внутренняя структура объектов может быть определена из анализа характеристических брэгговских пиков на больших углах [11, 13]. Метод может быть использован для анализа структуры различных дисперсных систем в интервале размеров от 1 до 100 нм.

Исследование процессов формирования металлических наночастиц в стабилизирующих полимерных средах с помощью МУР стало возможным благодаря новым методам интерпретации данных малоуглового рассеяния [11, 15, 23, 25, 26, 33, 49]. Эти методы, рассмотренные ранее, развитые в основном для исследования монодисперсных систем, главным образом белков, были успешно адаптированы к исследованию наноструктурированных объектов. Это дало возможность не только рассчитывать распределения по размерам наночастиц, но и определять детальные структурные модели из данных рассеяния [52–63].

Для того чтобы исследовать и структуру матриц, и распределения по размерам внедренных в них металлических наночастиц, вклады этих двух составляющих в общее рассеяние следует разделить. Традиционный метод вычитания рассеяния матрицей из общего рассеяния образцом возможен только в тех случаях, когда полимерная составляющая не меняет своей структуры в процессе формирования в ней наночастиц металла. В том случае, когда структурные изменения в матрице имели место, использовался метод аномального МУР [64, 65]. В этом методе экспериментальные кривые МУР измеряют при разных энергиях рентгеновского пучка: вдали от края полосы поглощения атомами данного металла (т.е. регистрируется рассеяние и от полимерной матрицы, и от наночастиц) и на склоне полосы (ослабляется рассеяние от металлических включений). Разность этих сигналов относится к рассеянию только наночастицами, содержащими атомы данного металла. Анализ вклада каждой из составляющих позволяет рассчитать распределение по размерам наночастиц металла и исследовать внутреннюю структуру полимерного комплекса.

При изучении сложных систем по данным МУР всегда встает вопрос однозначности полученных решений. Поэтому очень важна комплементарность МУР и других методов исследования структуры. При решении структурных задач дополнительно использовались данные электронной и атомно-силовой микроскопии, рентгеновской дифракции, динамического светорассеяния и некоторых других. По отдельности все эти методы безусловно информативны, но каждый из них имеет как свои достоинства, так и свои ограничения. И только сочетание нескольких методов позволяет получить наиболее полное представление о структуре сложных полимерных систем, содер-

жащих металлические наночастицы и снять проблему неоднозначности полученных решений.

Малоугловые рентгеновские исследования проводили с помощью лабораторного и синхротронного источников рентгеновского излучения: на лабораторном дифрактометре АМУР-К (разработка СКБ ИК РАН, Москва) при фиксированной длине волны излучения λ , равной 0.1542 нм, а также на синхротроне DESY в Гамбурге, Германия, накопительное кольцо DORIS III с помощью малоугловой камеры X33.

Малоугловые эксперименты по аномальному рассеянию также были проведены на синхротроне в Гамбурге на приборе JUSIFA [66] при различных энергиях падающего пучка [67]. Полученные экспериментальные данные малоуглового рассеяния обрабатывались и интерпретировались с помощью программ, входящих в комплекс ATSAS [68].

4.2.1. Процессы формирования и стабилизации металлических наночастиц в самоорганизующихся полимерных матрицах. Наши исследования металлических наночастиц в полимерных матрицах начались 15 лет назад в ИК РАН в связи с возникновением идеи их стабилизации с помощью самоорганизующихся комплексов полиэлектролитных гелей с противоположно заряженными поверхностно-активными веществами (ПАВ), так называемых сколлапсированных гелей. Как показали результаты малоугловых исследований, такие комплексы обладают выраженной регулярной структурой [69–73]. Поэтому предполагалось, что размер, форма и распределение по размерам металлических наночастиц в такой упорядоченной среде должны определяться структурными параметрами и свойствами полимерной матрицы. Первые исследования показали, что такие предположения верны.

Совместное применение методов традиционного и аномального МУР для такого рода образцов позволило изучить структурную организацию полимерных матриц различной природы с разрешением порядка 1 нм и одновременно рассчитать функции распределения по размерам сформированных в этих матрицах наночастиц благородных металлов и магнитных наночастиц [74–77]. Показано, что все изученные комплексы представляют собой структурно организованные наносистемы, в которых рост металлических частиц определяется условиями восстановления ионов металла, контролируется структурой полимерной сетки и ограничен размерами ее внутренних ячеек.

Коллапс полиэлектролитного геля и образование упорядоченной структуры выражаются появлением характеристического брэгговского пика на кривой малоуглового рассеяния (рис. 7, кривая 2). Однако сколлапсированные гели представляют собой сравнительно лабильные структурные образования, и внедрение в них соедине-

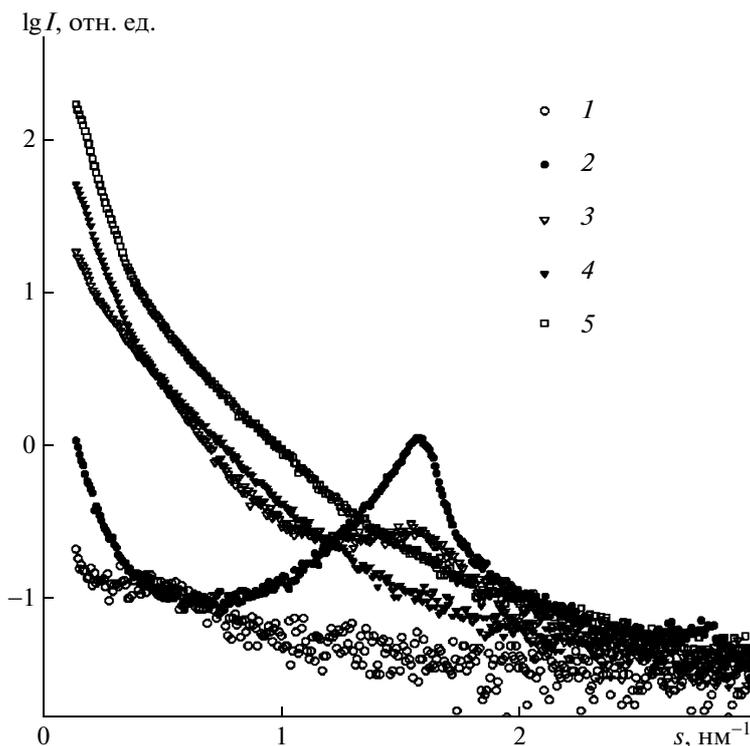


Рис. 7. Пример экспериментальных кривых малоуглового рассеяния в системе на основе катионного геля полидиаллилдиметиламмонийхлорида (PDADMACl) в комплексе с анионным ПАВ натрийдодecilбензилсульфоната (SDB): 1 – исходный гель; 2 – сколлапсированный гель; 3 – PDADMACl/SDBS с добавленным HAuCl_4 ; 4 – PDADMACl/SDBS с восстановленными наночастицами золота; 5 – PDADMACl гель без SDS после восстановления металлических ионов.

ний металла приводит к изменению структуры комплекса и уменьшению амплитуды пика (рис. 7, кривая 3). Еще более серьезные изменения строения полимерной матрицы происходят при восстановлении металла (рис. 7, кривая 4). Исчезновение брэгговского максимума свидетельствует о практически полном разупорядочении системы.

Тем не менее стабилизирующее действие полимерной матрицы наглядно проявляется при длительном хранении образцов: изменение объемной функции распределения по размерам в сторону резкого увеличения размеров металлических наночастиц происходило только в случае использования неструктурированных полиэлектролитных гелей (рис. 8, кривая 4) [74].

Полученные результаты были обнадеживающими, тем не менее изученные образцы обладали таким существенным недостатком, как высокая полидисперсность наночастиц металла (рис. 8). Причиной этого была обнаруженная с помощью МУР лабильность полимерных цепей в комплексе и, как следствие, возможность миграции ионов металла в пределах матрицы с образованием крупных кластеров и агрегатов в процессе восстановления металлических наночастиц. Этот недостаток ограничивал возможности практического применения подобных комплексов во многих об-

ластях, где монодисперсность наночастиц металла имела существенное значение, особенно в медицине и биологии, как и в целом ряде технологических приложений.

Тем не менее обнадеживающие первые результаты наших исследований дали импульс к поиску и изучению альтернативных систем формирования и стабилизации металлических наночастиц. Более жестко структурированными и соответственно более перспективными для практического применения были полимерные матрицы на основе мультислоевых полиоктадецилсилоксанов (PODS) [47–49]. В эти системы были введены соединения золота (AuCl_3) и платины (K_2PtCl_4 и $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) с последующим восстановлением ионов металлов с помощью Na_2BH_4 , H_2 , ультрафиолетового излучения, а также использовался способ самопроизвольного восстановления ионов.

По сравнению с комплексами гидрогель/ПАВ картина малоуглового рассеяния для PODS, содержащих металлические наночастицы золота и платины, богаче брэгговскими пиками (рис. 9). Эквиливантное расположение этих пиков свидетельствует о ламеллярном характере упорядочения полимерной матрицы. Периодичность $d = 5.24 \pm 0.03$ нм в пределах экспериментальной ошибки одинакова для всей серии изученных образцов и совпадает по величине с толщиной пол-

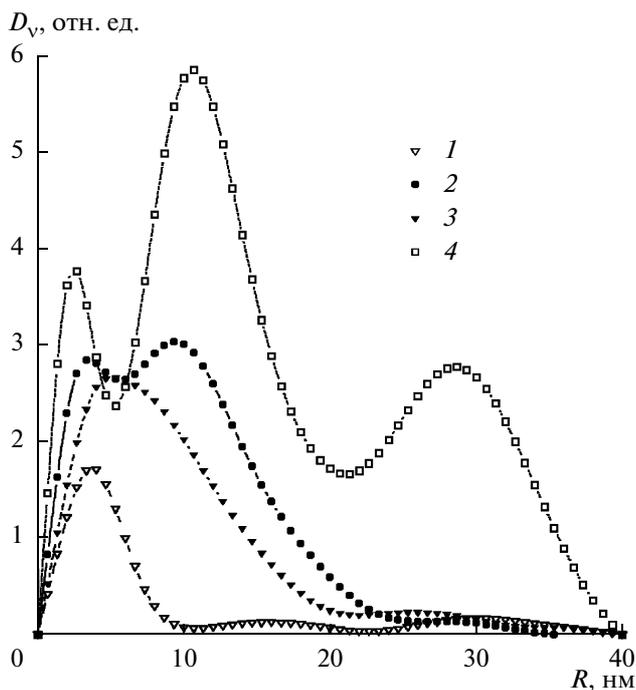


Рис. 8. Функции объемного распределения частиц по размерам в системе на основе катионного геля полидиаллилдиметиламмонийхлорида (PDADMACl) в комплексе с анионным ПАВ натрийдодецилбензилсульфоната (SDB): PDADMACl/SDBS с добавленным HAuCl_4 (1); PDADMACl/SDBS с восстановленными наночастицами золота сразу и спустя 35 дней после приготовления (2); PDADMACl гель без SDS сразу после восстановления металлических ионов (3); то же, что и для (3), но спустя 35 дней (4). Кривая 1 умножена на коэффициент 5 для лучшей визуализации.

ностью расплавленного бислоя $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{SiO}_x-\text{O}_x\text{Si}(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$. Существенно то, что структура комплексов на основе мультислоевых полиоктадецилсилоксанов в отличие от систем гидрогель/ПАВ мало меняется при восстановлении металла (рис. 9).

Метод МУР позволяет провести для таких систем детальный структурный анализ, включающий определение по размерам металлических наночастиц и построение подробной структурной модели комплекса в целом. Так, для полимерных матриц на основе мультислоевых полиоктадецилсилоксанов были рассчитаны центросимметричные профили электронной плотности в направлении, перпендикулярном плоскости ламеллы в мультислоевых структурах, с помощью одномерного фурье-преобразования:

$$\rho(r) = \sum_{l=1}^N A(s, l) s_l \cos(sr) = \sum_{l=1}^N [\pm\sqrt{S(l)}] s_l \cos(sr), \quad (24)$$

где N – число пиков, а s_l и $S(l)$ – положение и площадь первого брэгговского пика соответственно. Пример таких вычислений показан на рис. 10.

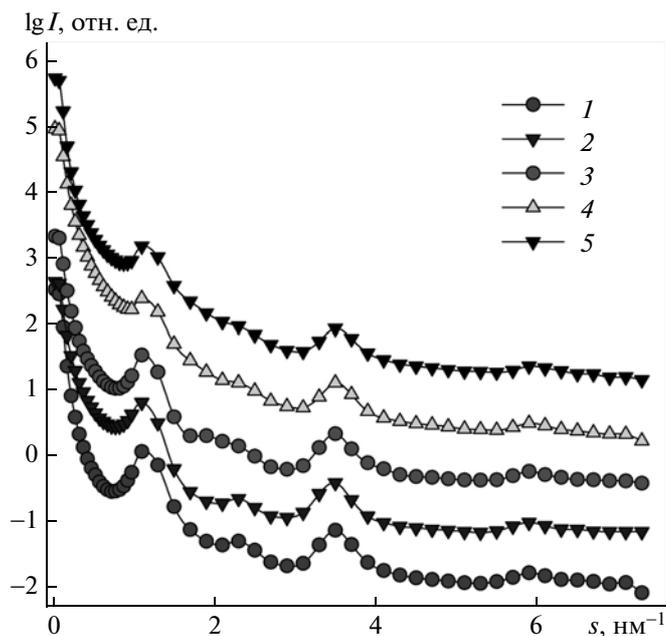


Рис. 9. Пример экспериментальных кривых малоуглового рассеяния полимерными матрицами на основе мультислоевых полиоктадецилсилоксанов: исходный PODS (1); PODS, модифицированный октадециленом (ODC) в качестве функциональных групп – PODS/ODC (2); PODS/ODC- $\text{K}[\text{PtCl}_3] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3); после восстановления ионов платины с помощью NaBH_4 (4) и с помощью H_2 (5).

Для полимерных матриц на основе мультислоевых полиоктадецилсилоксанов характерно образование более мелких наночастиц металлов (1–2 нм) с довольно узким распределением их по размерам [78–81]. Это распределение не зависит ни от использованного соединения металла, ни от способа его восстановления и определяется только структурой жесткой полисилоксановой матрицы. Совокупность данных МУР позволила предложить структурную модель (рис. 11), объясняющую характерные особенности формирования наночастиц металлов в таких системах [79].

4.2.2. Металлизированные мицеллярные системы. Интересным примером возможностей МУР для изучения сложных полимерных наносистем является исследование структуры металлизированных ди- ($\text{PEO}_{45}-b-\text{P4VP}_{28}$) и триблок ($\text{P4VP}_{29}-b-\text{PEO}_{273}-b-\text{P4VP}_{29}$) сополимеров [54]. Эта работа явилась логическим продолжением исследований в области нанокомпозитов, содержащих металлические наночастицы. Для получения структурных моделей было впервые для подобных систем применено восстановление формы с помощью *ab initio* методов. Определенные с помощью аномального МУР распределения по размерам металлических наночастиц платины показали, что они имеют размер около 2–3 нм и локализованы в мицеллах, образованных сополимерами. Эти мицеллы практически монодисперсны со средним

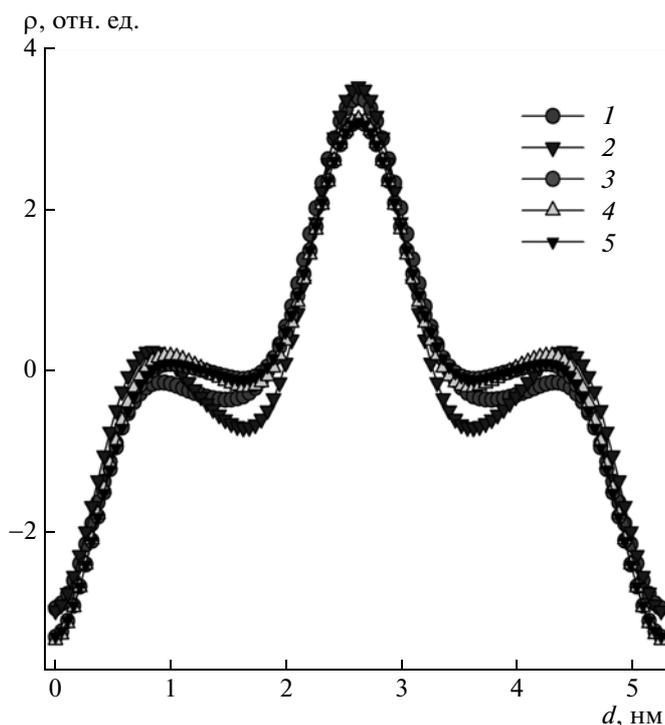


Рис. 10. Центросимметричные профили электронной плотности в направлении, перпендикулярном плоскости ламеллы в мультислойных структурах PODS/ODC. Обозначения, как и на рис. 9.

размером около 10 нм и агрегируют, образуя слегка сплюснутые полые сфероиды с размерами ~40 нм для ди-блок сополимера и ~45 нм для три-блок сополимера. При этом наночастицы Pt, сформиро-

ванные в мицеллах PEO₄₅-b-P4VP₂₈, систематически меньше по размерам, чем частицы восстановленные в мицеллах P4VP₂₉-b-PEO₂₇₃-P4VP₂₉. Используя данные малоуглового эксперимента в совокупности с атомно-силовой микроскопией, рентгеновской дифракцией и просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ), была предложена структурная модель формирования такого комплекса.

Таким образом, с помощью МУР-рассеяния показаны возможности и особенности формирования металлических наночастиц в различных структурно организованных полимерных матрицах. Достоинством таких систем является относительная простота приготовления достаточно мелких (от 1 до 4 нм) металлических наночастиц, а общим недостатком всех этих систем — невысокое (порядка нескольких процентов) содержание в них металла и полидисперсность образованных частиц. Такие системы могут успешно применяться в некоторых технических приложениях, например в катализе, но многие другие области, в особенности медицина и биология, выдвигают более жесткие требования к размерам и монодисперсности наночастиц.

4.2.3. Монодисперсные ферромагнитные наночастицы в растворе, стабилизированные биодеградируемыми полимерами. Одной из самых интересных и практически важных является проблема создания ферромагнитных жидкостей, т.е. коллоидных растворов ферромагнитных частиц нанометровых размеров. Существует несколько спо-

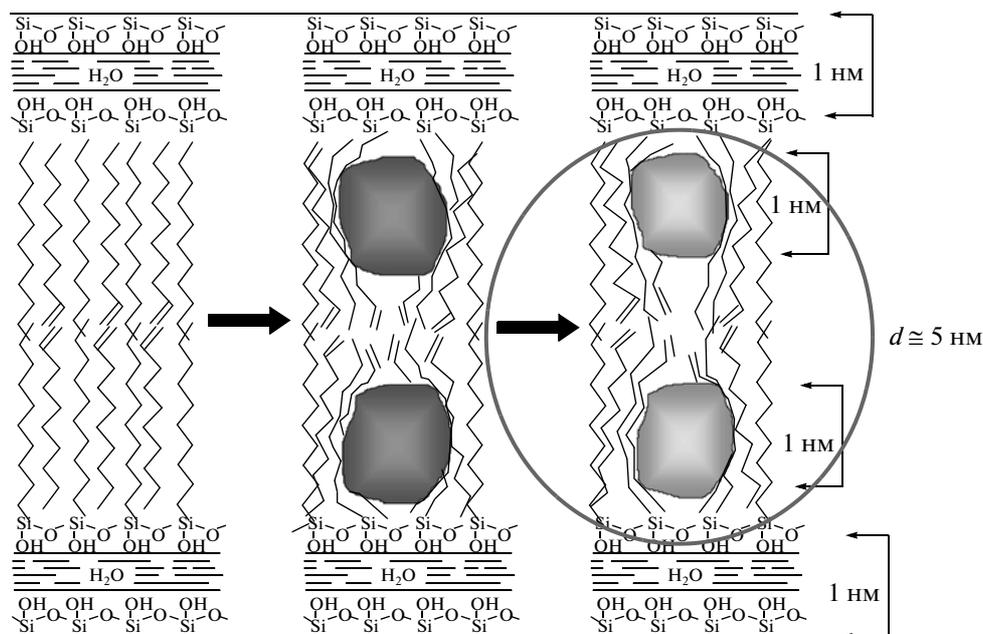


Рис. 11. Схематическое представление PODS-комплекса после модификации ODC, введения $K[PtCl_3] \times H_2O$ (темно-серый цвет) и восстановления металлических наночастиц (светло-серый цвет).

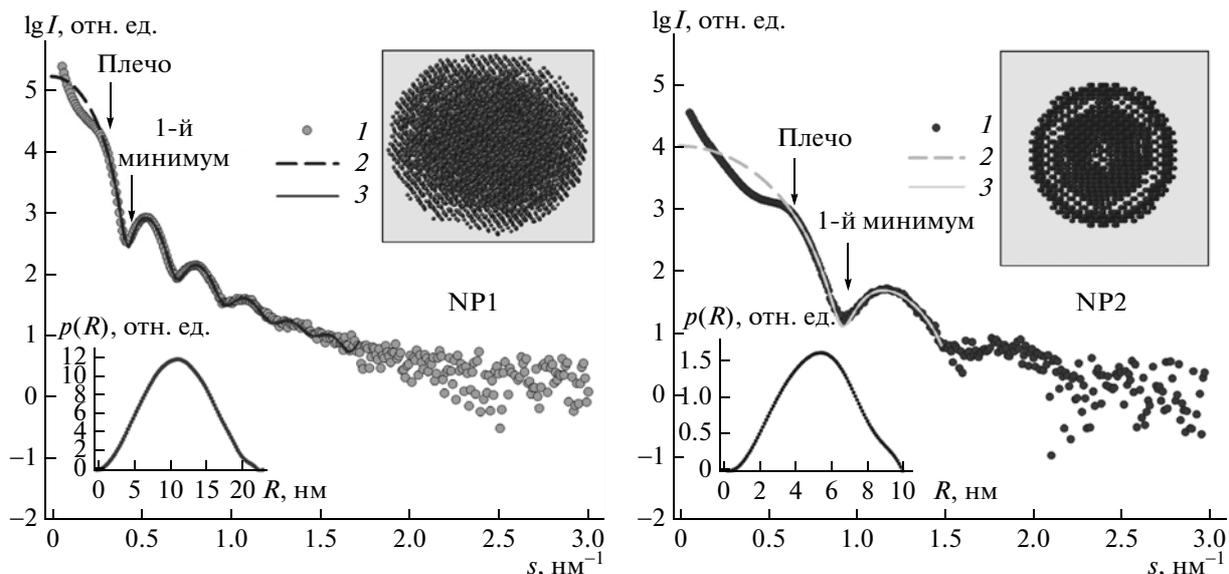


Рис. 12. Ферромагнитные наночастицы, покрытые модифицированными фосфолипидами: 1 – экспериментальные кривые малоуглового рассеяния; 2 – расчетная кривая рассеяния, экстраполированная в нулевой угол; 3 – кривая рассеяния от *ab initio* моделей. Вставки: слева внизу – функция распределения по расстояниям, использованная для *ab initio* моделирования; справа сверху – структурные модели ферромагнитных наночастиц.

способов получения магнитных наночастиц, но одним из самых популярных является метод термальной декомпозиции соединений железа, кобальта, никеля и некоторых других металлов в среде ПАВ. При таком способе синтеза получается достаточно узкое распределение по размерам, что очень важно с точки зрения практического применения ферронаноматериалов. Следующей задачей является стабилизация наночастиц в растворе. Для этого их покрывают защитной оболочкой из различных полимерных соединений, которая не дает возможности частицам агрегировать под влиянием ван-дер-ваальсовых или магнитных сил. В зависимости от того, какое соединение было использовано для инкапсулирования, можно получить коллоидные органические или водные растворы. Последние особенно важны для применения ферромагнитных жидкостей в медицине и биологии. В этом случае для защитных оболочек используются биосовместимые соединения, например полиэтиленгликоль. Структура ферромагнитных частиц с различными полимерными оболочками и их поведение в водных растворах подробно изучены методом МУР [55, 56, 62, 63].

Сферические наночастицы оксида железа, покрытые олеиновой кислотой, со средними диаметрами 20.1 (NP1) и 8.5 нм (NP2) синтезированы методом термальной декомпозиции в докоцене при 370°C (NP1) или в октадецене при 318°C (NP2) [55]. Чтобы сделать эти наночастицы водорастворимыми, они были инкапсулированы в модифицированные полиэтиленгликолем фосфолипиды.

Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от NP1 и NP2 в растворе (рис. 12) характерны для практически монодисперсных сферических частиц.

Радиусы инерции для обоих образцов, рассчитанные из положения первого минимума на кривой s_1 : $R = 4.49/s_1$, оказались равны 10.6 ± 0.6 нм для NP1 и 4.8 ± 0.3 нм для NP2. Эти значения очень хорошо коррелируют с оценкой диаметров этих наночастиц с помощью ПЭМ: 20.1 ± 0.8 и 8.5 ± 0.5 нм соответственно. Следует отметить, что благодаря высокой электронной плотности оксида железа относительно электронной плотности полимерной оболочки МУР, равно как и ПЭМ, фиксирует рассеяние практически только от металлического ядра, что затрудняет определение толщины защитного слоя наночастиц.

Характерной особенностью малоуглового рассеяния для этих наночастиц является перегиб плеча на экспериментальных кривых в области углов $s = 0.3$ и 0.6 nm^{-1} для NP1 и NP2 соответственно. Эта особенность рассеяния является отражением межчастичной интерференции и указывает на присутствие в растворе кластеров наночастиц, образовавшихся благодаря магнитному взаимодействию между ними. Поэтому анализ данных малоуглового рассеяния разделен на два этапа. Во-первых, было проведено *ab initio* моделирование структуры индивидуальных ферромагнитных наночастиц по данным рассеяния на больших углах. Результаты моделирования представлены на вставках рис. 12. Наночастицы NP1 и NP2 различаются не только размером, но и внутренним строением: в то время как плотность NP1

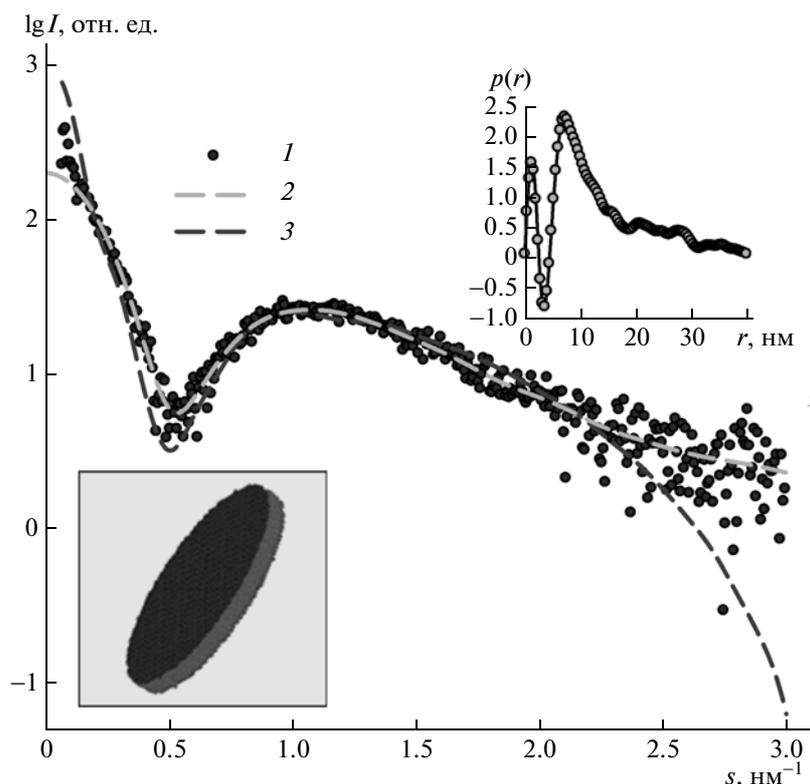


Рис. 13. Малоугловое рассеяние альтернативным PMAcOD-сополимером в растворе: 1 – экспериментальная кривая МУР; 2 – расчетная кривая рассеяния, экстраполированная в нулевой угол; 3 – модельная кривая рассеяния бислоевым диском, построенным из мономерных единиц MAcOD. Вставки: сверху справа – функция распределения по расстояниям; внизу слева – дискообразная модель PMAcOD-сополимера в растворе.

равномерно уменьшается от центра к периферии, NP2 имеют слоевую структуру. Эти различия определяются разными условиями синтеза: образование слоев предположительно происходит из-за присутствия не полностью выпаренного при более низкой температуре ПАВ, используемого при синтезе этих наночастиц.

Вторым этапом исследования было определение структуры кластеров наночастиц в растворе. Для этого использовались найденные структурные модели индивидуальных наночастиц, начальные участки кривых малоуглового рассеяния и программы, моделирующие взаимное расположение отдельных частиц друг относительно друга в пределах кластеров. Использовался метод молекулярной тектоники, описанный в разд. 2.3.

Для обоих образцов получены тетраэдрические кластеры. Оценка толщины стабилизирующего защитного фосфолипидного слоя по расстоянию между наночастицами дала значения 2.4 ± 0.5 нм и 1.4 ± 0.2 нм для NP1 и NP2 соответственно. Средние диаметры кластеров аппроксимирующих сфер (D) равны 50 и 35 нм для NP1 и NP2 соответственно. Эти значения хорошо согласуются с гидродинамическими размерами D_h , полученными с помощью динамического светорассеяния.

Аналогичным образом проведены исследования наночастиц оксида железа, стабилизированных с помощью альтернативного сополимера, содержащего блоки октадецена и малеиновой кислоты (PMAcOD) [56]. Поскольку задачей этой и двух последующих работ [62, 63] было оценить влияние защитной полимерной оболочки на стабильность ферромагнитных наночастиц в растворе, впервые было проведено исследование структуры самого альтернативного сополимера в воде.

Экспериментальная кривая PMAcOD-сополимера в растворе показана на рис. 13. Функция распределения по расстояниям $p(r)$, вычисленная по этой кривой (рис. 13, вставка), показывает, что максимальный размер мицелл, которые образует PMAcOD в воде, равен примерно 40 нм. При этом функция $p(r)$ содержит отрицательные значения в области межатомных расстояний около 3–4 нм. Такие отрицательные значения типичны для липидных бислоевых структур и являются следствием более низкой электронной плотности гидрофобных областей относительно воды. Расстояние 3–4 нм соответствует толщине двойного слоя, образованного гидрофобными хвостами PMAcOD мономеров (1.6 нм на один гидрофобный хвост).

Для того чтобы понять, как происходит самосборка PMAcOD сополимера в растворе, с помощью программы Cerius2 (версия 3.5, MSI/Accel-

rys) [81] построены пространственные модели отдельных МАСОD-звеньев полимерной цепи, а также короткие РМАСОD цепи, состоящие из этих звеньев. Полученные структурные блоки были использованы для построения пространственных моделей мицелл, бимицелл, полых цилиндров, дисков и ассоциатов, состоящих из этих форм. При этом учитывались полученные из анализа функции распределения по расстояниям $p(r)$ размерности: все модели имели максимальный размер около 40 нм и толщину бислоя от 3 до 4 нм. Затем от этих моделей были рассчитаны интенсивности МУР, которые сравнивались с экспериментальной кривой. Оказалось, что хорошее приближение к экспериментальным данным дает только бислой в форме диска, сконструированный из отдельных МАСОD-звеньев полимерной цепи, диаметром 40 и толщиной бислоя 3.2 нм (рис. 13, кривая 3). Таким образом, после гидролиза РМАСОD сополимер образует в воде бислоевые дискообразные структуры. Было также показано, что эти структуры не существуют в растворе в присутствии ферромагнитных наночастиц: в качестве защитного слоя каждый такой диск используется на покрытие одной наночастицы оксида железа. При этом 99.9% объемной фракции ферромагнитных наночастиц, покрытых РМАСОD-сополимером, не агрегируют и находятся в растворе в виде индивидуальных частиц.

В отличие от ферромагнитных наночастиц, стабилизированных модифицированными фосфолипидами, магнитные жидкости на основе альтернативного РМАСОD-сополимера содержат некоторое количество истинных агрегатов. О том, что в данном случае происходит агрегация, а не образование динамических кластеров магнитных наночастиц, свидетельствует изменение начального участка кривой малоуглового рассеяния: вместо плеча на экспериментальных кривых, отражающего межчастичную интерференцию, наблюдается характерный подъем кривой в самых малых углах, указывающий на присутствие больших размеров в растворе (рис. 14).

Анализ кривых МУР и функции распределения по расстояниям $p(r)$ для ферромагнитных наночастиц с полимерной оболочкой на основе альтернативного РМАСОD-сополимера позволили определить размер и форму наночастиц, толщину полимерной оболочки, а также размер и форму агрегатов.

Наночастицы оксида железа представляли собой практически сферические тела с радиусом 7.9 нм ($R = 4.49/s_1$) и слоевой внутренней структурой. Полученный с помощью МУР размер хорошо соответствует диаметру наночастицы в 16.0 нм, по данным ПЭМ. Агрегаты ферромагнитных наночастиц являются конгломератами неправильной формы, которые содержат около 30–40 индивидуальных наночастиц, и их объем-

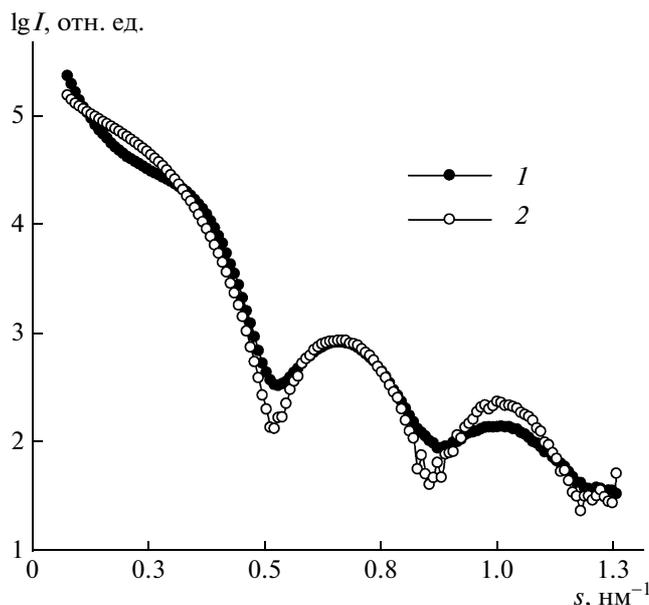


Рис. 14. Сравнение кривых малоуглового рассеяния: 1 – рассеяние наночастицами, стабилизированными модифицированными фосфолипидами (интерференция наночастиц в кластерах); 2 – рассеяние наночастицами, покрытыми альтернативным РМАСОD-сополимером (отсутствие интерференции и присутствие больших размеров).

ная фракция, по данным МУР, не превышает 0.1%. Толщина стабилизирующей оболочки определена из графика функции распределения по расстояниям и она оказалась равна ~ 1.2 нм.

Поскольку именно защитная оболочка наночастиц определяет возможность их агрегации, проведено детальное изучение влияния свойств полимерного покрытия наночастиц на их поведение в растворе [62, 63]. Для этой цели альтернативный полимер РМАСОD был модифицирован полиэтиленгликолем с молекулярной массой 5000 дальтон (серия Р), полиэтиленгликолем с молекулярной массой 750 дальтон (серия S) и с помощью коротких этиленгликольных хвостов (серия G). Оказалось, что полимеры серии Р и G могут использоваться для стабилизации наночастиц оксида железа, в то время как РМАСОD-сополимер, модифицированный низкомолекулярным полиэтиленгликолем (серия S), не присоединяется к поверхности наночастиц и не может быть использован для их стабилизации. Для объяснения этого явления были исследованы процессы мицеллообразования в воде всех трех серий модифицированного РМАСОD-сополимера при разных концентрациях в растворе. Концентрационная зависимость наблюдалась для полимеров серий Р и G, но отсутствовала для серии S.

Структурное моделирование показало, что полимеры разных серий образуют в растворе мицеллы разного рода (рис. 15): для серий G и S наблюдаются бислои в форме дисков, а для серии Р *ab*

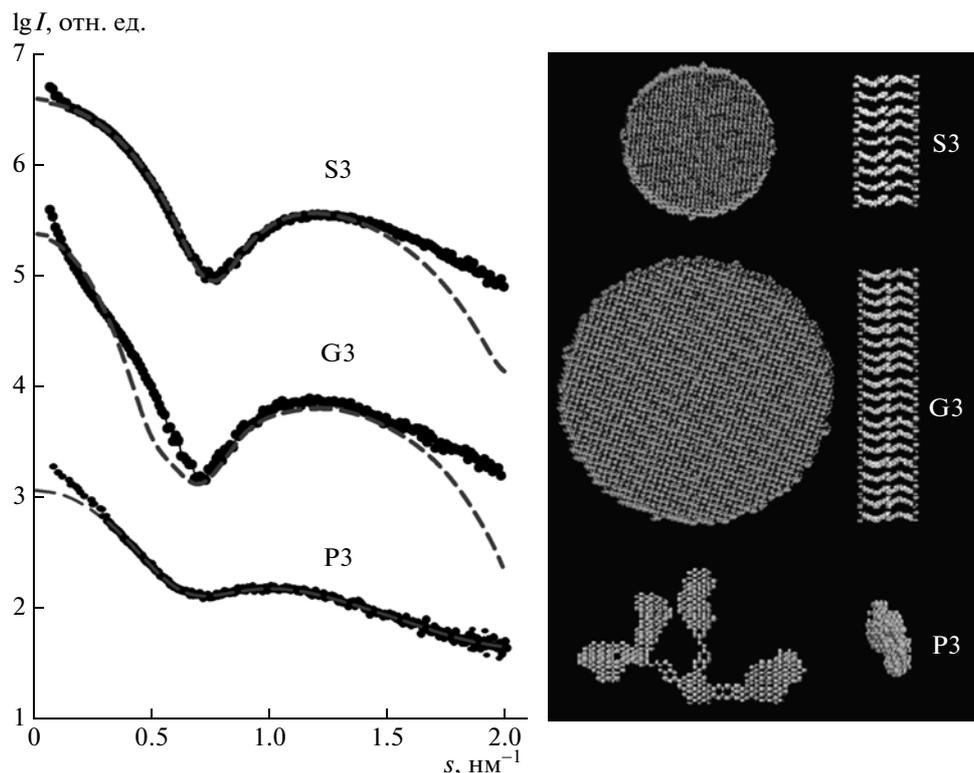


Рис. 15. Структурное моделирование для модифицированного РМАсОD-сополимера: черные кружочки – экспериментальные кривые; пунктир – кривые рассеяния от моделей. Правая панель: дискообразные модели для S и G образцов в двух ориентациях и *ab initio* моделирование для сополимера серии P. Отдельно показана структура плотного образования в мицеллах серии P.

initio моделирование выявило существование агрегатов пространственно разделенных плотных субъединиц. Для модельных дисков полимера серии G диаметр был равен 18 нм с толщиной бислоя 4.8 нм, в то время как для серии S диаметр диска 10 нм, а толщина бислоя равна 5.0 нм. Отдельные плотные образования в мицеллах полимера серии P аппроксимировались слегка сплюснутым телом диаметром 5.5 нм.

Наши исследования показали, что РМАсОD-сополимер, модифицированный низкомолекулярным полиэтиленгликолем (серия S), образует плотные, энергетически устойчивые структуры, что не способствует их взаимодействию с такими внешними гидрофобными объектами, как поверхности наночастиц оксида железа. В то же время мицеллы серии G и особенно серии P менее стабильны в растворе, и гидрофобные поверхности ферромагнитных наночастиц могут конкурировать с процессами самосборки этих сополимеров, соединяться с ними и соответственно создавать защитные слои с их помощью.

Как результат наших структурных исследований были предложены модели, объясняющие особенности строения мицелл разных серий (рис. 16).

Сополимеры серий G и P с разной степенью модификации были использованы в дальнейшем

для создания защитных оболочек наночастиц оксида железа разных размеров. Различная степень модификации РМАсОD сополимера необходима для того, чтобы выявить наиболее приемлемые условия стабилизации наночастиц в растворе.

Анализ данных МУР проведен в два этапа. Первым этапом было определение структурных характеристик индивидуальных наночастиц оксида железа по кривым МУР в интервале углов $s > 0.3 \text{ nm}^{-1}$. На втором этапе исследовали взаимодействие наночастиц, используя для этого начальный участок профиля рассеяния. Структурные модели, полученные на первом этапе, были использованы во второй фазе нашего исследования для изучения поведения покрытых различными защитными оболочками ферромагнитных наночастиц в растворе.

Восстановленные *ab initio* формы ферромагнитных наночастиц разных размеров, как и в [55, 56], представляли собой сферические тела с внутренней слоистой структурой, обусловленной присутствием остаточного количества ПАВ, используемых при синтезе наночастиц оксида железа. Размеры наночастиц были определены по первому минимуму на кривой рассеяния и полученные значения совпали с данными ПЭМ.

В зависимости от степени модификации и соответственно плотности и толщины создаваемых по-

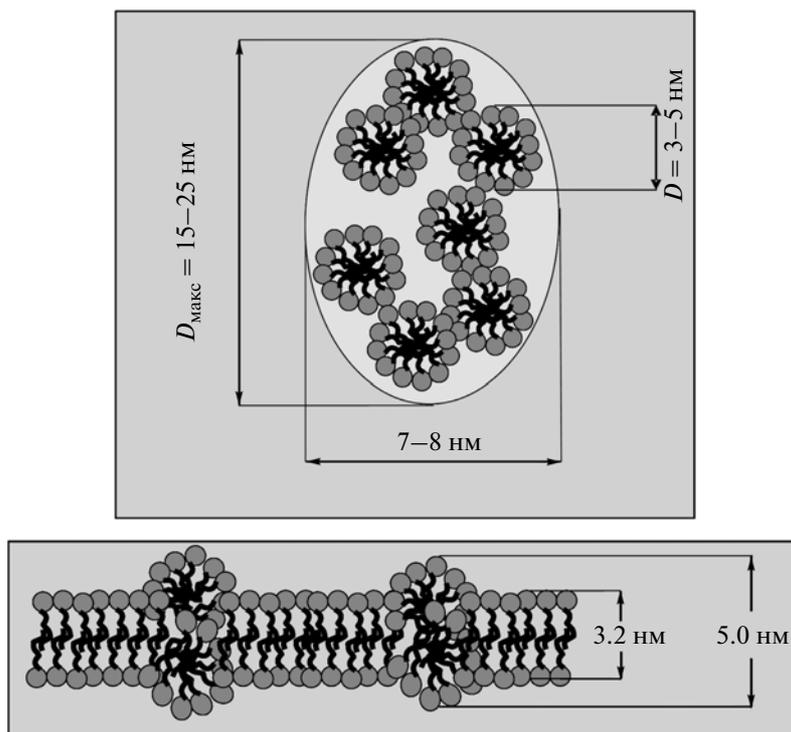


Рис. 16. Структурные модели мицелл: верхняя панель – гипотетическая модель структуры Р сополимера в растворе; нижняя панель – гипотетическая модель частичной сегрегации мицеллярных слоев.

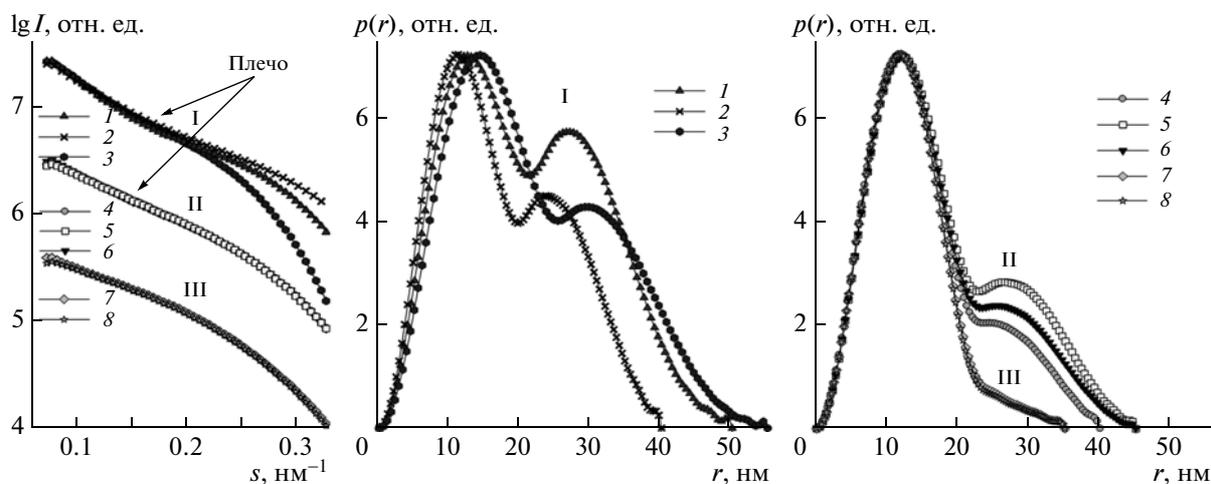


Рис. 17. 1 – сравнение начальных участков кривых рассеяния; 2 и 3 – функции распределения по расстояниям для наночастиц, покрытых защитными сополимерами серий G и P с разной степенью модификации и толщины.

лимерных оболочек изученные образцы можно разделить на три группы, как это показано на рис. 17.

Следует отметить, что все изученные образцы содержат в основном индивидуальные наночастицы оксида железа, а также некоторое количество динамических кластеров и агрегатов в разных соотношениях в зависимости от свойств защитных оболочек. Как видно из рис. 17, начальные участки экспериментальных кривых в интервале угловых векторов $0.07 < s < 0.3 \text{ nm}^{-1}$ отличаются друг от друга по форме.

Рассеяние образцами 1, 2 и 3 характеризуется хорошо выраженным плечом в интервале $0.10\text{--}0.20 \text{ nm}^{-1}$ и, следовательно, в основном отражает межчастичную интерференцию и образование динамических кластеров взаимодействующих наночастиц. Наночастицы этой группы покрыты наиболее плотными оболочками сополимера РМАсОD серии Р. Кроме того, все наночастицы этой группы имеют разные размеры, из чего следует, что взаимодействие наночастиц в растворе

определяется не их размером, а свойствами защитного слоя.

Для второй группы образцов (4, 5 и 6) межчастичная интерференция выражена слабо. К этой группе также относятся образцы, стабилизированные сополимером РМасОД серии Р, но с меньшей степенью модификации, а также наночастицы, покрытые немодифицированным сополимером РМасОД (образец 4).

Рассеяние образцами 7 и 8 (третья группа) не имеет признаков межчастичной интерференции. К этой группе относятся наночастицы, покрытые сополимером РМасОД серии G.

Функции распределения по расстояниям, рассчитанные по экспериментальным кривым малоуглового рассеяния, также с очевидностью разделяются на три группы, содержащие те же самые образцы. Профили $p(r)$ демонстрируют присутствие динамических кластеров и некоторого количества наиболее крупных агрегатов в первой группе, в то время как третья группа содержит в основном индивидуальные наночастицы и маленькие агрегаты, предположительно преимущественно в виде димеров. Во второй группе образцов в растворе происходит и межчастичная интерференция и агрегация наночастиц. Моделирование взаимного расположения наночастиц в растворе с использованием молекулярной тектоники подтвердило полученные результаты.

Таким образом, показано, что отрицательно заряженные наночастицы оксида железа, защищенные модифицированным сополимером РМасОД серий Р и G, содержат только небольшое количество агрегатов и демонстрируют высокую стабильность в водных растворах, что принципиально важно для практического применения этих наночастиц в биологии и медицине. Уменьшение степени модификации сополимера и толщины оболочки приводит к большей агрегации частиц для образцов серии Р, однако образцы серии G вообще не содержат крупных агрегатов.

Приведенные в этом разделе результаты исследований металлических наночастиц в различных матрицах показывают огромный потенциал МУР для анализа подобных объектов. Эти работы также демонстрируют эффективность новых методов интерпретации МУР не только для биологических, но и для самых сложных наноструктурированных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Зеркалом развития МУР являются международные конференции, посвященные этому методу. Первая такая конференция состоялась в Сиракузах, штат Нью-Йорк, США в 1965 г. под председательством Гарри Брамбергера (1926–2000), работавшего под руководством Питера Дебая (1884–1966), одного из основателей МУР. С тех пор такие научные встречи проводятся регулярно

(каждые три года) и собирают примерно по 500 участников из более чем 30 стран мира. Последняя по времени XIV Международная конференция по малоугловому рассеянию состоялась осенью 2009 г. в Оксфорде (Англия) и собрала 453 зарегистрированных участника, которые представили 456 докладов. Доклады были распределены по 19 секциям таким образом, как это показано на диаграмме (рис. 18). Из них 10 докладов имели статус пленарных, 133 устных, остальные стендовые.

Распределение докладов по секциям неравномерно и отражает направленность интересов ученых и/или их финансирования в общем русле научных исследований. Наибольшее внимание сейчас концентрируется по трем направлениям: полимерная тематика (84 доклада), инструменты (65 докладов) и исследование биологических объектов (59 докладов). Можно также выделить секции изучения металлизированных систем (36 докладов), коллоидных исследований (30 докладов) и теоретическую секцию (30 докладов). Практически все доклады, за исключением, может быть, сугубо теоретических, имели отношение к нанотехнологиям, наноматериалам и наноструктурам. Это вполне созвучно времени и отражает реальную направленность сегодняшних научных исследований. МУР уже давно из экзотического, малоизвестного метода превратился в эффективный рабочий инструмент для исследования наноструктурированных материалов. Такой прорыв произошел благодаря двум основным факторам: развитие теории и методов интерпретации данных МУР и гигантский скачок в технике измерений, в первую очередь связанный с яркими синхротронными источниками.

Можно вспомнить, что еще не так давно — всего три десятилетия назад — основными результатами малоугловых исследований были хорошо (по тем временам) измеренные инварианты рассеяния, определение формы некоторых монодисперсных рассеивающих объектов (в основном белков) и интегральные характеристики полимеров. Но еще раньше началась теоретическая разработка таких методов интерпретации данных рассеяния, которые сегодня дают возможность по одномерной кривой малоуглового рассеяния восстановить трехмерную структуру вещества. О серьезном продвижении в этом направлении свидетельствует большое количество докладов, посвященных этой тематике, вместе с чисто теоретической частью и моделированием методы интерпретации данных МУР были представлены в 51 докладе. Крайне актуальны и востребованы способы интерпретации данных МУР, основанные на методах регуляризации, нелинейной оптимизации, эвристических алгоритмах и пр. В развитие таких подходов существенный вклад был внесен многолетними совместными работа-

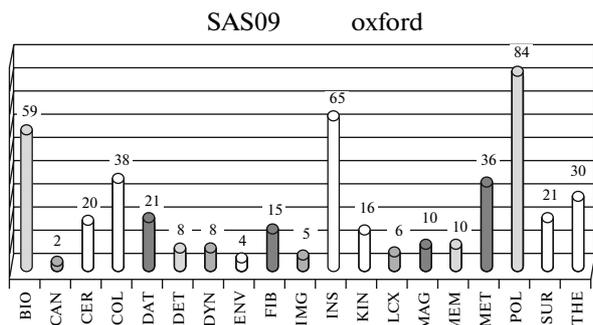


Рис. 18. Диаграмма распределений докладов по секциям: BIO – биологические системы; CAN – CAN-SAS симпозиум; CER – керамика, стекла и пористые системы; COL – коллоидные системы и растворы; DAT – обработка данных; DET – детекторы; DYN – техника исследования динамики; ENV – экология; FIB – иерархические системы и волокна; IMG – формирование изображений; INS – инструментальная секция; KIN – кинетические измерения; LCX – жидкокристаллические системы и реология; MAG – магнитные системы; MEM – мембраны и бислои; MET – металлизированные системы; POL – полимерные системы; SUR – поверхности и интерфейсы; THE – теория и моделирование.

ми Лаборатории малоуглового рассеяния Института кристаллографии РАН и Группой малоуглового рассеяния Европейской лаборатории молекулярной биологии в Гамбурге. Мало того, что эти методы прекрасно работают, развиваются и используются во многих лабораториях мира, их разработчики предоставляют теперь возможность расчета моделей on-line (<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online/>).

Сейчас уже не стоит вопрос, является ли МУР узкоспециальной дисциплиной, необходимой только небольшому количеству специалистов: ежегодное количество статей по рентгеновскому и нейтронному МУР в цитируемых журналах мира возросло с нескольких десятков в 1950 г. до тысяч в настоящее время, и насыщения пока не наблюдается. Метод применяется ко все более сложным и важным биологическим и наноструктурированным объектам, причем результаты МУР имеют как самостоятельное значение, так и дополняют и расширяют структурную и функциональную информацию, полученную другими методиками.

Широкое применение СИ открывает двойные перспективы для МУР. С одной стороны, быстрые измерения с использованием малых количеств образцов позволяют проводить такие широкомасштабные исследования, как комбинаторный анализ структурных откликов на изменения внешних условий. При этом стандартизация и автоматизация самого эксперимента и анализа данных играет первоочередную роль, и такие автоматические линии уже существуют на синхротронах третьего поколения. С другой стороны, уникальные параметры новейших источников СИ (микронные и субмикронные размеры пучка, его когерентность,

возможность исследований в широком диапазоне длин волн) дают возможность проводить концептуально новые эксперименты. Можно ожидать, что дальнейшее развитие МУР на синхротронах третьего поколения послужит также мостом к проведению будущих экспериментов, использующих лазеры на свободных электронах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковальчук М.В., Кон В.Г. // УФН. 1986. Т. 149. Вып. 1. С. 69.
2. Kovalchuk M.V., Kazimirov A.Yu., Zheludeva S.I. // Nucl. Instrum. Methods. Res. 1995. № 101. P. 435.
3. Friedrich W., Knipping P., Laue M. // Ann. Phys. 1913. B. 14. S. 971.
4. Schluenzen F., Tocilj A., Zarivach R. et al. // Cell. 2000. V. 102(5). P. 615.
5. Вайнштейн Б.К. Современная кристаллография. Т. 1. М.: Наука, 1979. 384 с.
6. Guinier A., Fournet G. Small-Angle Scattering of X-rays. John Wiley and Sons, New York, 1955. 269 p.
7. Рольбин Ю.А., Свергун Д.И., Фейгин Л.А. и др. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 255. С. 1497.
8. Agirrezabala X., Martin-Benito J., Caston J.R. et al. // EMBO J. 2005. V. 24. P. 3820.
9. Могилевский Л.Ю., Дембо А.Т., Свергун Д.И., Фейгин Л.А. // Кристаллография. 1984. Т. 29. С. 587.
10. Feigin L.A., Svergun D.I., Dembo A.T. et al. // Nucl. Instrum. Meth. A. 1989. V. 282. № 2–3. P. 486.
11. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 279 с. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. New York: Plenum Press, 1987. 335 p.
12. Guinier A. // Ann. Phys. 1939 V. 12. P. 161.
13. Glatter O., Kratky O. Small-Angle X-ray Scattering. London: Acad. Press, 1982. 515 p.
14. Glatter O. // J. Appl. Cryst. 1977. V. 10. P. 415.
15. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 1277.
16. Никитфоров А.Ф., Уваров В.Б. Основы теории специальных функций. М.: Наука, 1974. 521 с.
17. Stuhrmann H.B. // Acta Cryst. A. 1970. V. 26. P. 297.
18. Stuhrmann H.B. // Z. Phys. Chem. (Frankfurt am Main). 1970. B. 72. S. 177.
19. Свергун Д.И., Фейгин Л.А., Шедрин Б.М. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 261. С. 878.
20. Свергун Д.И., Фейгин Л.А., Шедрин Б.М. // Кристаллография. 1981. Т. 26. С. 1163.
21. Konarev P.V., Petoukhov M.V., Volkov V.V., Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 2006. V. 39. P. 277.
22. Svergun D.I., Volkov V.V., Kozin M.B., Stuhrmann H.B. // Acta Cryst. A. 1996. V. 52. P. 419.
23. Svergun D.I. // Biophys. J. 1999. V. 76. P. 2879.
24. Chacon P., Moran F., Diaz E. et al. // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 2760.
25. Franke D., Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 2009. V. 42. P. 342.

26. Volkov V.V., Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 860.
27. Амарантов С.В. // ЖЭТФ. 2009. Т.135. № 04. С. 721.
28. Kozin M.B., Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 2001. V. 34. P. 33.
29. Mertens H.D., Svergun D.I. // J. Struct. Biol. 2010. V. 172(1). P. 128.
30. Сердюк И., Заккау Н., Заккау Дж. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика. В 2 —х т. Изд-во Книжный дом “Университет”, 2009–2010. 1304 с.
31. Levitt M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 3183.
32. Petoukhov M.V., Svergun D.I. // Biophys. J. 2005. V. 89. P. 1237.
33. Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 1991. V. 24. P. 485.
34. Михайлин И.М., Тернов И.М. Синхротронное излучение. М.: Знание, 1988. 64 с.
35. Stuhrmann H.B. // Q. Rev. Biophys. 1981. V. 14(3). P. 433.
36. Cammarata M., Eybert L., Ewald F. et al. // Rev Sci Instrum. 2009. V. 80(1). P. 15.
37. Koch M.H., Bras W. // Ann. Rep. Prog. Chem. C: Phys. Chem. 2008. V. 104. P. 35.
38. H. Tsuruta H., Irving T.C. // Struct. Biol. 2008. V. 18(5). P. 601.
39. Roessle M.W., Klaering R., Ristau U. et al. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 190.
40. Round A., Franke D., Moritz S. et al. // J. Appl. Cryst. 2008. V. 41. P. 913.
41. Boye P., Feldkamp J.M., Patommel J. et al. // Fabrication and Modeling Journal of Physics. Conference Series. 2009. 186: 012063-1-012063-3.
42. Svergun D.I., Feigin L.A., Schedrin B.M. // Soviet Physics — Doklady. 1981. V. 26. № 12. P. 1109.
43. Svergun D.I., Feigin L.A., Schedrin B.M. // Acta Cryst. A. 1982. V. 38. P. 827.
44. Agirrezabala X., Martin-Benito J., Caston J.R. et al. // EMBO J. 2005. V. 24. P. 3820.
45. Svergun D.I., Stuhrmann H.B. // Acta Cryst. A. 1991. V. 47. P. 736.
46. Blow J.J., Dutta A. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2005. V. 6. P. 476.
47. Lee C., Hong B., Choi J.M. et al. // Nature. 2004. V. 430(7002). P. 913.
48. De Marco V., Gillespie P.J., Li A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106(47). P. 19807.
49. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. // J. Appl. Crystallogr. 1995. V. 28. P. 768.
50. Prischi F., Konarev P.V., Iannuzzi C. et al. // Nat. Commun. 2010. V. 1. P. 95.
51. Schmid G. Nanoparticles: From Theory to Application. New York: Wiley Interscience. 2004. 443.
52. Volkov V.V., Kajushina R.L., Lapuk V.A. et al. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 503.
53. Shtykova E.V., Shtykova E.V., Volkov V.V. et al. // J. Appl. Crystallogr. 2003. V. 36. P. 669.
54. Bronstein L.M., Sidorov S.N., Zhironov V. et al. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. P. 18786.
55. Shtykova E.V., Huang X., Remmes N. et al. // J. Phys. Chem. 2007. V. 111. P. 18078.
56. Shtykova E.V., Gao X., Huang X. et al. // J. Phys. Chem. 2008. V. 112. P. 16809.
57. Yevdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Shtykova E.V. et al. // The Open Nanoscience Journal. 2008. V. 2. P. 17.
58. Bronstein L.M., Kostylev M., Shtykova E.V. et al. // Langmuir. 2008. V. 24. P. 12618.
59. Волков В.В., Ланук В.А., Штыкова Э.В. и др. // Кристаллография. 2008. Т. 53. № 3. С. 499.
60. Штыкова Э.В., Дембо К.А., Волков В.В. и др. // Российские нанотехнологии. 2009. Т.4. № 9–10. С. 64.
61. Shtykova E.V., Volkov V.V., Salyanov V.I., Yevdokimov Y.M. // Eur. Biophys. J. 2010. V. 39. P. 1313.
62. Bronstein L.M., Shtykova E.V., Malyutin A. et al. // J. Phys. Chem. C. 2010. V. 114. P. 21900.
63. Shtykova E.V., Malyutin A., Dyke J et al. // J. Phys. Chem. C. 2010. V. 114. P. 21908.
64. Stuhrmann H.B., Goerigk G., Munk B. In Handbook on Synchrotron Radiation / Eds. Rubenstein E., Ebashi S., Koch M. Elsevier: Amsterdam, 1994. 555.
65. Haubold H.-G., Gebhardt R., Buth G., Goerigk G. In Resonant Anomalous X-ray Scattering / Eds. Materlik G., Sparkks C. J., Fischer K. Elsevier Science: Oxford, 1994. 295.
66. Haubold H.-G., Gruenhagen K., Wagener M. et al. // Rev. Sci. Instrum. 1989. V. 60. P. 1943.
67. Haubold H.-G., Gebhardt R., Buth G., Goerigk G. In Resonant Anomalous X-ray Scattering / Eds. Materlik G., Sparkks C.J., Fischer K. Elsevier Science, Oxford, 1994. 295 p.
68. Petoukhov M.V., Konarev P.V., Kikhney A.G., Svergun D.I. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 223.
69. Хандурина Ю.В., Дембо А.Т., Рогачева В.Б. и др. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. С. 235.
70. Okuzaki H., Osada Y. // Macromol. 1995. V. 28. P. 380.
71. Dembo A.T., Yakunin A.N., Zaitsev V.S. et al. // J. Polym. Sci.: Polym. Physics. 1996. V. 34. P. 2893.
72. Bronstein L.M., Platonova O.A., Yakunin A.N. et al. // Langmuir. 1998. V. 14. P. 252.
73. Bronstein L.M., Platonova O.A., Yakunin A.N. et al. // Colloids Surf. A. 1999. P. 147.
74. Svergun D.I., Shtykova E.V., Dembo A.T. et al. // J. Chem. Phys. 1998. V. 109. P. 11109.
75. Svergun D.I., Shtykova E.V., Kozin M.B. et al. // J. Phys. Chem. B. 2000. V. 104. P. 5242.
76. Starodoubtsev S.G., Saenko E.V., Khokhlov A.R. et al. // Microelectron. Eng. 2003. V. 69(2–4). P. 324.
77. Свєргун Д.И., Штыкова Э.В., Козин М.Б. и др. // Кристаллография. 2001. Т.46. № 4. С. 651.
78. Svergun D.I., Kozin M.B., Konarev P.V. // Chem. Mater. 2000. V. 12. P. 3552.
79. Shtykova E.V. Svergun D.I., Chernyshov D.M. et al. // J. Phys. Chem. B. 2004. V. 108. P. 6175.
80. Bronstein L.M., Shtykova E.V., Spontak R.J., Svergun D.I. // Abstracts of Papers of the Amer. Chem. Soc. 2005. V. 230. P. 319.
81. MSI Cerius2, Version 3.5. Molecular Simulation Inc.: San Diego, USA, 1997. 112 p.