

На правах рукописи



**Петерс Георгий Сергеевич**

**РАЗВИТИЕ МЕТОДА МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО  
РАССЕЯНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ  
СЛАБОУПОРЯДОЧЕННЫХ СИСТЕМ НА СИНХРОТРОННОЙ  
СТАНЦИИ «БИОМУР»**

1.3.2. – Приборы и методы экспериментальной физики

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»).

Научный руководитель: **Конарев Петр Валерьевич** – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории рефлектометрии и малоуглового рассеяния федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Москва.

Официальные оппоненты: **Авдеев Михаил Васильевич** – доктор физико-математических наук, начальник сектора 2 нейтронной оптики Научно-экспериментального отдела нейтронных исследований конденсированных сред Объединенного института ядерных исследований, г. Дубна;

**Щербина Максим Анатольевич** – доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональных полимерных структур Института синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, г. Москва.

Ведущая организация: Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск.

Защита состоится 15 февраля 2024 г., начало в 16:30, на заседании диссертационного совета 02.1.003.01 на базе НИЦ «Курчатовский институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский институт» и на сайте [www.ngsk.ru](http://www.ngsk.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
02.1.003.01, к.ф.-м.н.



В.А. Демин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность работы*

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) является на сегодняшний день одним из наиболее востребованных структурных методов. Повышенный интерес к данному методу обусловлен несколькими факторами. В первую очередь, имеется много фундаментальных и прикладных задач, связанных с исследованием слабоупорядоченных систем как биологического, так и неорганического происхождения, количество которых, в силу их естественного многообразия, существенно превышает количество неорганических материалов. Также в востребованности метода МУРР играет важную роль его основное преимущество, заключающееся в возможности исследования структур вещества в нативном состоянии, то есть именно в том виде, в котором они существуют в естественной среде, к примеру, в организме человека или животного. Метод может использоваться как самостоятельно, так и являться вспомогательным, например, при построении моделей биомакромолекул.

На пути практической реализации метода МУРР стоят несколько весьма существенных проблем. В первую очередь следует отметить, что восстановление структуры вещества по данным МУРР является обратной задачей – а они, зачастую, математически плохо обусловлены и неустойчивы. С практической точки зрения это значит, что для получения достоверных данных следует избавляться от влияния шумовой составляющей. Все это требует установки и настройки дополнительного оборудования. А учитывая, что рассматриваемые объекты в силу своей низкой степени упорядоченности и невысокого контраста электронной плотности дают довольно слабый сигнал по сравнению с дифракционными максимумами от кристаллических структур, для решения таких задач целесообразно использовать высокоинтенсивные источники СИ. К тому же, для исследований широкого ряда объектов на станции МУРР необходимо предусматривать различные варианты специального окружения образца.

До недавних пор в России инструментальная база для исследований методом МУРР была представлена либо станциями, специализирующимися на широкоугловом рассеянии, либо лабораторными источниками с низкой интенсивностью. На Курчатовском источнике синхротронного излучения (КИСИ) в Москве в 2004 году была установлена станция «ДИКСИ» [1]. Однако несовершенство оборудования станции накладывало весьма существенные ограничения при проведении малоугловых экспериментов. Похожая по своим техническим характеристикам станция «ФРАКС» [2] построена на источнике ВЭПП-3 в Новосибирске. Лабораторные же источники, имея в принципе неплохую конфигурацию оборудования, в частности, систему коллимации, как на установке АМУР-К в Институте кристаллографии в Москве [3], обладают довольно низкой интенсивностью рентгеновского пучка, делающей практически невозможным проведение времяразрешающих экспериментов и значительно затрудняющей проведение экспериментов с изменениями физико-химических параметров исследуемого вещества ввиду большого времени экспозиции, требуемого для накопления приемлемого сигнала для всего лишь одной рентгенограммы. В связи с этим актуальным видится создание современной универсальной установки, реализующей методику МУРР и предназначенной для неразрушающего исследования объектов различного происхождения, на базе Курчатовского источника синхротронного излучения в Москве.

### ***Научная новизна***

Впервые в России спроектирована и создана универсальная станция на источнике синхротронного излучения для проведения неразрушающих исследований широкого спектра объектов с неупорядоченной или частично упорядоченной структурой методом малоуглового рентгеновского рассеяния. В ходе оптимизации схемы и оборудования созданной станции удалось добиться улучшения отношения сигнал-шум в рабочем диапазоне углов в 2 раза и контрастности рентгенограмм в 3.5 раза. Разработана новая конструкция микрофлюидной ячейки с плоскопараллельными окнами, использование которой

позволяет проводить исследования динамики быстропротекающих процессов в растворах. На созданной станции впервые получены трехмерные пространственные структуры аптамеров, используемые для связывания с белком-шипом коронавирусной инфекции, а также структуры их бинарных комплексов. Предложен новый алгоритм оценки стартовых значений распределений по размерам для полидисперсных систем, корректность работы которого проверена на эксперименте по определению размеров наночастиц кремнезоль. Проведено исследование механизмов деформации пленок полилактида при растяжении, демонстрирующее расширенные возможности станции, и показана линейная зависимость значений инварианта Порода от степени деформации.

### *Постановка задачи*

Работа посвящена созданию аппаратуры и развитию методики малоуглового рассеяния на источнике синхротронного излучения на поворотном магните для проведения неразрушающих исследований структуры вещества, а также оптимизации схемы проведения экспериментов и алгоритмов обработки данных на основе опыта эксплуатации созданной станции. Были поставлены следующие задачи:

- Проектирование и строительство универсальной станции, реализующей метод МУРР, на новом канале КИСИ;
- Оптимизация схемы станции на основе опыта эксплуатации;
- Разработка и внедрение нового оборудования для проведения исследований вещества в динамике;
- Оценка повышения качества получаемых экспериментальных малоугловых данных;
- Развитие новых алгоритмов обработки данных с целью улучшения качества и точности результатов анализа.

## *Основные положения, выносимые на защиту*

1. Синхротронная станция «БиоМУР», отвечающая требованиям, предъявляемым методом малоуглового рассеяния к конфигурации оборудования, с оптимизированной за счет применения нерассеивающих щелей в коллимационной системе и подбора материала вакуумных окон схемой позволяет проводить исследования широкого спектра структур биоорганического происхождения и получать малоугловые кривые с точностью на уровне 0.1-0.2%.
2. Многоканальная микрофлюидная ячейка с плоскопараллельными окнами позволяет проводить исследования жидких образцов в проточном режиме, а также устранить паразитное рассеяние, связанное с конфигурацией используемого держателя в воздушном окружении.
3. Методика обработки экспериментальных результатов малоуглового рассеяния от полидисперсных систем, оптимизированная за счет внедрения априорной оценки стартовых значений параметров распределений, обеспечивает сходимость к глобальному минимуму целевой функции и, тем самым, надежность решения обратной задачи восстановления по форме малоугловых кривых распределения по размерам.
4. Результаты исследования процесса образования продольных дефектов в пленках полилактида при деформации на воздухе, проведенного с применением асимптотики Порода для ориентированных систем, демонстрируют возможность проведения исследований образцов произвольной формы в динамике на станции «БиоМУР».
5. Примененная на станции методика отбора наиболее реакционноспособных молекул аптамеров позволила определить структурные параметры и установить конформацию аптамера к белку-шипу коронавируса по данным малоуглового рассеяния.

### *Личный вклад автора*

В основу работы положены результаты технических, методических разработок и научных исследований, выполненных автором за время работы в должности инженера-исследователя в НИЦ «Курчатовский институт».

Автор непосредственно участвовал в монтаже новой станции «БиоМУР», предложил и реализовал модификацию узлов установки, обеспечил функционирование систем сбора и обработки данных. Включенные в диссертацию результаты научных исследований были получены лично автором или при его непосредственном участии.

### *Апробация работы*

Основные результаты диссертации докладывались на следующих конференциях:

- 16th International Conference on Small-Angle Scattering (SAS2015), Берлин, 2015.
- Первый Российский кристаллографический конгресс, Москва, 2016.
- III Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – наука молодых», Нижний Новгород, 2017.
- Совещание пользователей Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований, Московская область, 2017.
- ESRF User Meeting 2020, Гренобль, 2020.
- Synchrotron and Free electron laser Radiation: generation and application (SFR-2020), Новосибирск, 2020.
- EMBL Hamburg P12 Virtual User Meeting, Гамбург, 2021.
- Synchrotron and Free electron laser Radiation: generation and application (SFR-2022), Новосибирск, 2022.
- IX Международная конференция «Лазерные, плазменные исследования и технологии» («ЛаПлаз-2023»), Москва, 2023.

## *Публикации*

Материалы диссертации опубликованы в 9 печатных работах, включая 9 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК, и 5 тезисах докладов.

## *Структура и объем диссертации*

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения и библиографии, общий объем диссертации 180 страниц, включая 88 рисунков и 11 таблиц. Библиография включает 154 наименования на 12 страницах.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи, показаны научная новизна и практическая значимость исследований.

**Глава 1. Исследования вещества методом малоуглового рентгеновского рассеяния: основные особенности и требования, предъявляемые к установкам.** В первой главе дано общее описание метода малоуглового рентгеновского рассеяния и приведен обзор подходов, применяемых для исследования систем различных типов. Описано устройство малоугловых установок и различные варианты исполнения их отдельных узлов. Приведен анализ возможностей оборудования для реализации метода МУРР и учета требований, предъявляемых им к конструкции.

### **Глава 2. Многофункциональная малоугловая станция «БиоМУР»**

**2.1 Использование модульного подхода при конструировании станции с применением готовых оптических узлов**

Оборудование, устанавливаемое на пути прохождения пучка на малоугловой станции, можно разделить на несколько независимых блоков, каждый из которых выполняет свою функцию. Это блок оптических элементов (монохроматор и зеркало), блок коллимации, держатель образца и его окружение, камера рассеяния, детектор, система управления станцией. Каждый из блоков может настраиваться, модифицироваться и переноситься на другую аналогичную станцию МУРР при условии наличия и работоспособности всех остальных



блоков. Это обстоятельство позволяет существенно упростить и ускорить проектирование малоугловых станций.

При создании новой станции, получившей название «БиоМУР», соответственно предполагаемому кругу решаемых задач (проведению экспериментов по малоугловому рассеянию на образцах различного типа, но преимущественно органического происхождения), был изучен опыт эксплуатации станции «ДИКСИ» [1], а также малоугловой станции X33, построенной на DESY (г. Гамбург) [4]. Внедренные при этом модификации показаны на рисунке 1.

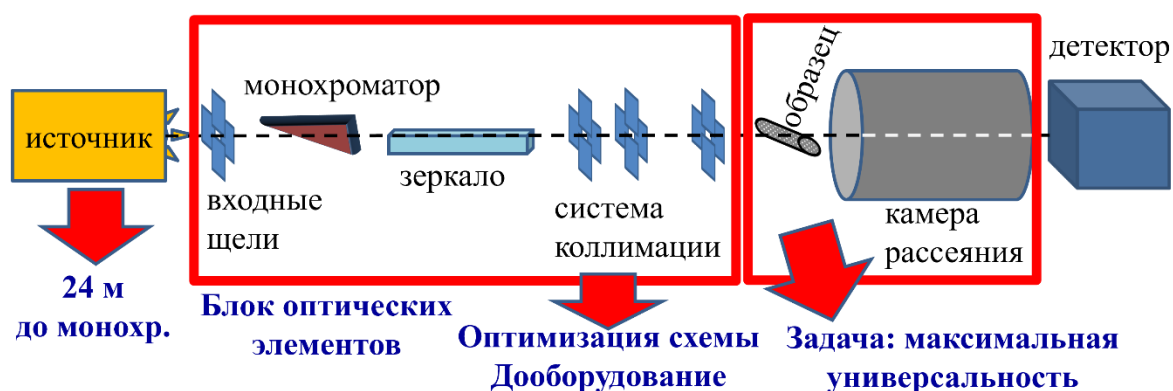


Рисунок 1 – Схема новой станции «БиоМУР» с указанием подхода к установке отдельных ее узлов в рамках выполнения работы.

Монохроматор, зеркало и система коллимации были исходно взяты единым блоком с выведенной из эксплуатации станции X33. В качестве детектора была выбрана модель DECTRIS Pilatus3 1M – этот детектор обладает широким динамическим диапазоном и нулевым уровнем собственного шума. Расстояние от источника излучения – поворотного магнита – до монохроматора составляет 24 метра. Была заменена система коллимации с использованием нерассеивающих щелей, перед последним блоком был установлен датчик положения пучка. Окружение образца было спроектировано полностью заново, учитывая поставленные в работе задачи по конструированию универсальной станции.

## 2.2 Оптимизация системы коллимации

Система коллимации со станции X33 показала себя в эксплуатации не лучшим образом в силу наличия паразитного рассеяния на кромках щелей, весьма существенно влиявшего на малоугловой фон. Для исправления данной ситуации

вместо второго и третьего блока были установлены два новых комплекта нерассеивающих щелей компании JJ X-Ray (Дания). На концах их створок установлены кристаллы Si(110) толщиной 380 мкм и наклоном относительно створки 20°. После замены щелей коллимации значительно уменьшился общий фон (показано на рисунке 2, б). Так, соотношение интенсивности первого дифракционного максимума бегената серебра, использующегося на станции в качестве калибровочного стандарта, к интенсивности малоуглового рассеяния (рисунок 2, в) выросло более чем в 3 раза, с 0.29 до 1.09, что является показателем улучшения контрастности получаемых рентгенограмм.

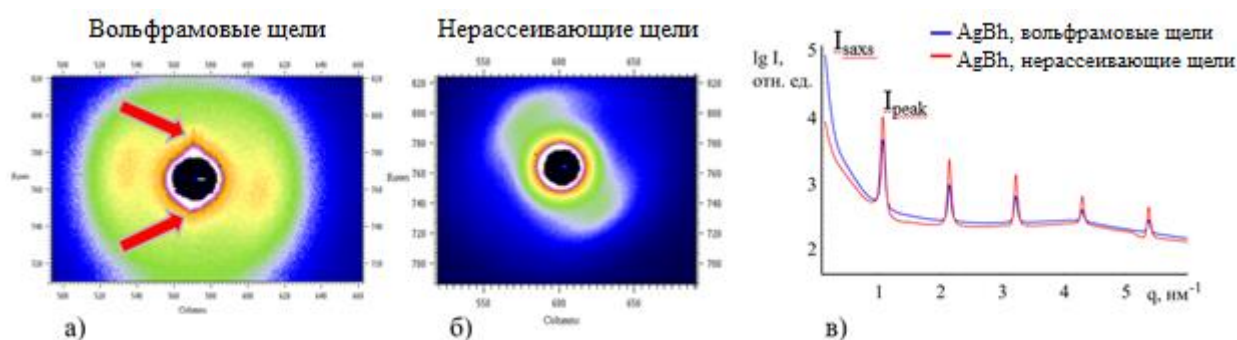


Рисунок 2 – Рентгенограммы без образца вблизи прямого пучка – до замены щелей (а) и после (б). Красными стрелками показаны эффекты рассеяния на створках. Сравнение кривых дифракции от бегената серебра до и после замены щелей (в).  $I_{saxs}$  – интенсивность МУРР,  $I_{peak}$  – интенсивность первого максимума.

Здесь и далее  $q = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$  – вектор рассеяния ( $2\theta$  – угол рассеяния,  $\lambda$  – длина волны излучения).

### 2.3 Особенности окружения образца и пространства образец-детектор

Для станции был спроектирован узел образца с возможностью установки различных вариантов держателей, показанный на рисунке 3. Это термостатируемый держатель для капиллярных образцов (рисунок 3, а) и держатель для образцов произвольной формы (рисунок 3, б). Данные конструкции позволяют устанавливать одновременно несколько образцов с возможностью их дистанционной смены, не прерывая эксперимент. Поток фотонов на образце был измерен экспериментально, он составляет  $1.86 \times 10^{10}$  фот/с.

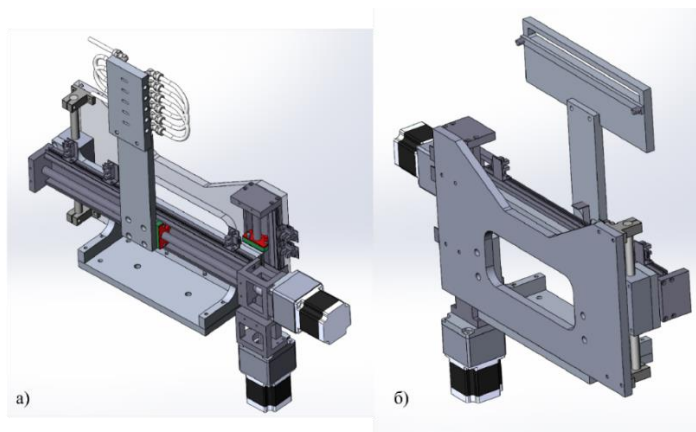


Рисунок 3 – Держатели для капиллярных образцов (а) и образцов произвольной формы (б) для станции «БиоМУР».

Для позиционирования образцов на пучке был сконструирован компактный узел наблюдения за образцом с использованием небольшого плоского зеркала, расположенного под углом к видеокамере, близким к  $45^\circ$ , чтобы изображение, проецируемое на матрицу, совпадало с тем, которое «видит» прямой пучок при проведении эксперимента. Поле зрения видеокамеры составляет  $40 \times 35$  мм.

Вместе с узлом окружения образца была также спроектирована и изготовлена новая камера рассеяния, позволяющая вакуумировать пространство образец-детектор, изменяя его при этом в пределах от 150 до 2500 мм с шагом 50 мм, достигаемом за счет комбинирования наборных секций. Это позволяет обеспечить угловой диапазон с векторами рассеяния  $q$  от  $0.04$  до  $30 \text{ nm}^{-1}$ .

С точки зрения минимизации фона также важным является вопрос подбора материала вакуумных окон. Исходно выбранный майлар толщиной 15 мкм давал существенный анизотропный сигнал рассеяния в малых углах, плохо поддававшийся учету при обработке. Исследования потенциальных материалов для замены окон были проведены на установке АМУР-К [3] в ФНИЦ «КиФ» РАН (рисунок 4, а). В результате в качестве нового материала была выбрана слюда толщиной 40 мкм. Графики малоугловых кривых, полученных при использовании вакуумных окон из майлара и из слюды, показаны на рисунке 4, б, в.

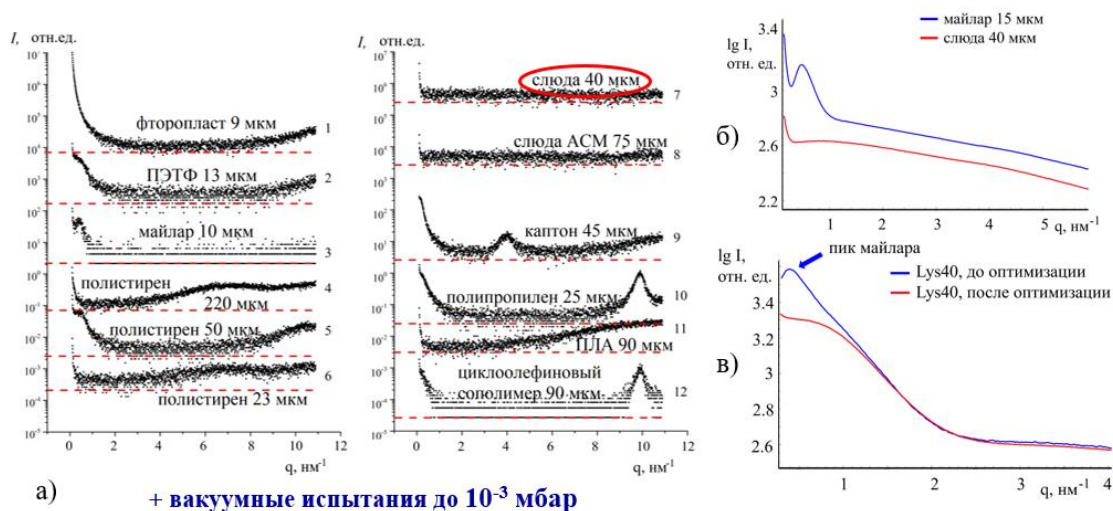


Рисунок 4 – Кривые МУРР от возможных материалов окон (а), красным выделен выбранный материал. Тестовые кривые МУРР с использованием окон из майлара и слюды – без образца (б), образец лизоцим концентрации 40 мг/мл (в).

## 2.4 Система автоматизированного управления станцией

Новая станция содержит в своем составе большое количество электромеханических элементов. Большая их часть представлена шаговыми двигателями. Осуществление юстировки вручную в такой ситуации выглядит нецелесообразным. Поэтому для управления всеми узлами станции централизованно, с одного рабочего места, была разработана отдельная система автоматизированного управления (САУ) станцией.

Спектр решаемых на станции научных задач требует высокой гибкости системы управления и обеспечения возможности ее подстройки под конкретные эксперименты. По результатам обзора существующих подходов к построению подобных систем на других синхротронах [5, 6] для использования в качестве основы САУ была выбрана программная платформа TANGO, получившая широкое распространение и ставшая, фактически, стандартом построения систем автоматизации научного оборудования на синхротронных источниках.

Для построения графического интерфейса системы был использован пакет Taurus. Для управления отдельными узлами станции было разработано специальное программное обеспечение и графические интерфейсы. Для удобства главная панель управления была визуализирована в соответствии с оптической

схемой станции, при этом все представленные на ней пиктограммы узлов являются интерактивными и запускают отдельные окна управления при нажатии.

## 2.5. Результаты оптимизации оптической схемы станции «БиоМУР»

В ходе конструирования и размещения оборудования оптическая схема станции претерпела существенные изменения и была оптимизирована для достижения поставленных в работе целей по созданию многофункциональной станции, пригодной к исследованиям образцов различных типов. Поэтому показательной является оценка прогресса, достигнутого при проведении экспериментов в результате оптимизации схемы станции «БиоМУР», запущенной в эксплуатацию в декабре 2017 года.

Сводка итоговых технических характеристик станции «БиоМУР» представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики станции «БиоМУР».

Монохроматор	Si(111), изгиб
Расстояние до источника	24.25 м
Рабочая апертура монохр.	10x4 мм
Зеркало	Длина 1000 мм, изгиб
<b>Система коллимации</b>	<b>Трехщелевая, вакуум, нерассеив. кромки</b>
Камеры рассеяния	100-2500 мм
<b>Уровень вакуума</b>	<b>10<sup>-6</sup> мбар</b>
<b>САУ</b>	<b>есть</b>
Система стабилизации	есть
<b>Кол-во образцов в серии</b>	<b>5-20</b>
Пропускная способность	120 обр/сут (12.2021)
<b>Среднее время настройки</b>	<b>менее 15 мин</b>

После ввода станции «БиоМУР» в эксплуатацию для определения степени достоверности получаемых результатов был подготовлен раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) концентрации 20 мг/мл в стандартном растворе HEPES с pH 7.4. Была проведена съемка со временем экспозиции 180 секунд при

расстоянии образец-детектор 700 мм. На рисунке 5 показан полученный результат и сравнение с кривой из базы данных SASBDB [7]. Видно, что в пределах погрешностей измерений кривые совпадают.

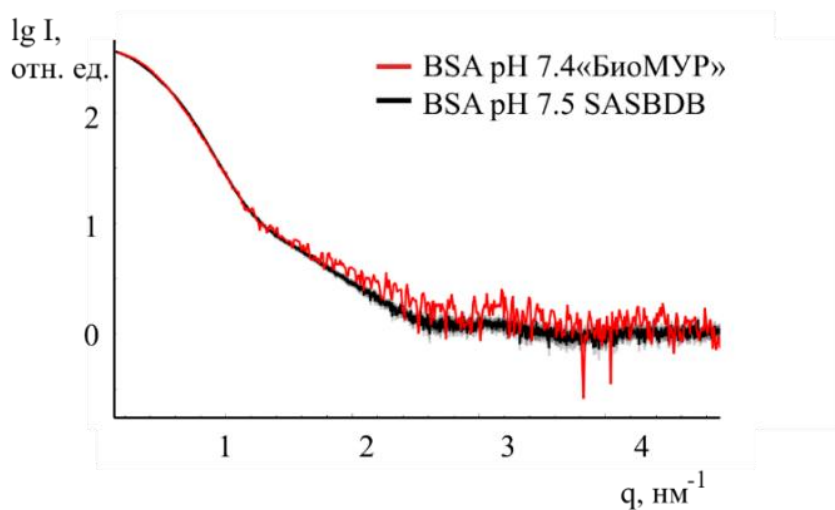


Рисунок 5 – Сравнение кривых МУРР белка BSA на станции «БиоМУР» и из базы данных SASBDB (буфер 50 Mm HEPES-KCl, pH 7.5, код SASDA32).

Количественным показателем улучшения является уменьшение уровня шума. Оценка соотношения сигнал-шум проводилась путем вычисления отношения среднеквадратичного разброса интенсивности  $\sigma$  точек графика при выходе на плато на больших углах рассеяния ( $q$  от 2.5 до 3.5 нм<sup>-1</sup>) к среднему значению  $I_{\text{mean}}$  при аппроксимации линейной функцией в программе OriginPro 2021 по формуле  $\sigma/I_{\text{mean}}$ . По данной методике был оценен уровень шума кривых МУРР после проведенной оптимизации схемы. Для сведения к минимуму влияния концентрации на уровень шума концентрация лизоцима была повышена до 40 мг/мл. Оценка отношения  $\sigma/I_{\text{mean}}$  дает значение 0.16% для эксперимента до оптимизации, 0.12% после, то есть улучшение в 1.5 раза. После вычитания буфера – 6.4% до оптимизации, 2.8% после – уменьшение в 2 раза. Повышение чувствительности станции показывают эксперименты с серией концентраций белка BSA (рисунок 6), где приемлемый сигнал теперь получается после обработки кривой белка концентрации 5 мг/мл – ранее такие концентрации приводили к зашумленному сигналу и проблемам с вычитанием.

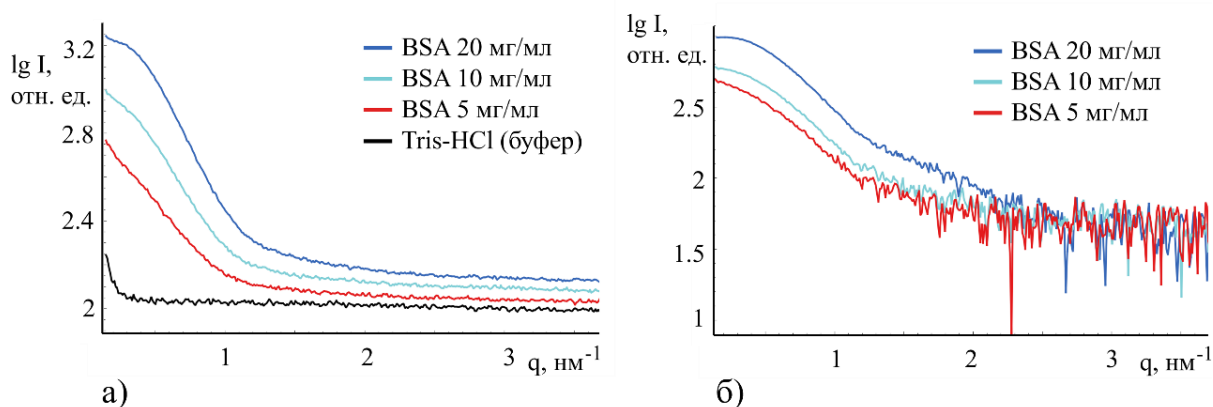


Рисунок 6 – Кривые МУРР серии концентраций BSA pH 7.4 – исходные (а) и после вычитания буфера (б). Данные получены после оптимизации схемы.

Для всех кривых, полученных в двух описанных выше экспериментах, был определен радиус Гинье с помощью программы PRIMUS [8], а также построены графики функций  $p(r)$  в программе GNOM [9]. В таблице 2 показаны вычисленные параметры кривых МУРР. Параметр Total quality estimate [10] характеризует общее качество проведенной программой GNOM автоматической обработки. Значение параметра выше 0.5 является критерием приемлемого качества малоугловой кривой и моделирования программой.

Таблица 2. Сравнение параметров кривых МУРР от тестовых белков.

Образец	Состояние станции (1 – до опт., 2 – после опт.)	Конц., мг/мл	$R_g$ (Гинье), нм	$R_g$ (из $p(r)$ ), нм	Параметр Total quality estimate программы GNOM
Лизоцим	1	40	1.46±0.02	1.49±0.03	0.58
	2	40	1.35±0.01	1.37±0.02	0.67
BSA	1	20	2.86±0.05	2.81±0.05	0.55
	2	20	2.80±0.03	2.82±0.03	0.65
		10	2.81±0.03	2.85±0.05	0.63
		5	2.96±0.03	2.95±0.03	0.58

Полученные и описанные выше результаты позволили сформулировать первое положение, выносимое на защиту.

### Глава 3. Оптимизация методики проведения экспериментов и обработки данных малоуглового рассеяния для образцов в растворах.

#### **3.1. Применение новой конструкции микрофлюидной ячейки с плоскопараллельными окнами для исследования жидких образцов**

Особенностью метода МУРР является то, что результирующая картина на детекторе включает в себя вклад от всех рассеивающих неоднородностей, в частности, молекул воздуха. Поэтому проведение экспериментов в воздушном окружении, необходимом для достижения большей универсальности конструкции станции, сопряжено с некоторыми трудностями. Сразу после выхода пучка СИ из пролетной базы имеет место рассеяние рентгеновского пучка еще до образца, что приводит к возникновению интенсивного засвета на детекторе, трудно поддающегося вычитанию ввиду разброса используемых капилляров по толщине до 30%. Это существенно увеличивает время обработки результатов измерений. Наконец, применение капилляров с заранее приготовленными образцами делает невозможным исследование динамики формирования получаемого раствора.

Для решения описанных проблем совместно с инженерами из ФНИЦ «КиФ» РАН и Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону) была разработана конструкция, показанная на рисунке 7. Она уже включает в своем составе диафрагму, устраняющую проблему рассеяния на воздухе до образца.

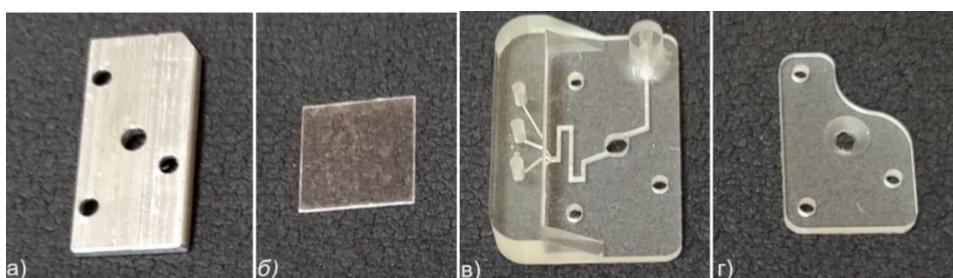


Рисунок 7 – Многоканальная микрофлюидная ячейка: а – диафрагма, б – рентгенопрозрачное окно, в – тело ячейки, г – прижимная платформа.

Технические данные: габариты 30x15x6 мм, диаметр камеры 3 мм, объем камеры 7 мкл, количество каналов 3, сечение каналов 30 мкм<sup>2</sup>, объем каналов: коротких 0.1 мкл, длинных 0.6 мкл, сечение отводящего канала 125 мкм<sup>2</sup>.



Для проведения экспериментов ячейка устанавливается в специальный держатель, также разработанный и сконструированный совместно с ячейкой. Термостатирование образца происходит за счет циркуляции жидкости по каналам внутри латунной шайбы с обратной стороны держателя. Отверстие в шайбе обеспечивает рабочий диапазон углов рассеяния до  $30^\circ$ .

В сочетании с уменьшением экспозиции без существенной потери качества кривых МУРР (соотношение  $\sigma/I_{\text{mean}}$  для ячейки 4.6% при времени экспозиции 60 с) новая ячейка дает возможность проводить исследования динамики процессов при заполнении рабочей камеры раствором. Для испытания ячейки был поставлен следующий эксперимент: запускалась непрерывная съемка 60-секундных рентгенограмм, одновременно к уже находящемуся в ячейке буферному раствору NaAc pH 4.5 добавлялся раствор лизоцима одной из трех концентраций – 10, 20, 40 мг/мл. Затем через 10 мин к раствору лизоцима добавлялся раствор NaCl (осадителя), концентрация которого ступенчато повышалась каждые 10 мин значениями 12, 18, 24 мг/мл. На рисунке 8 представлена двумерная карта распределения интенсивности кривых рассеяния после вычитания из буферного раствора для серии экспериментов с концентрацией раствора лизоцима 20 мг/мл.

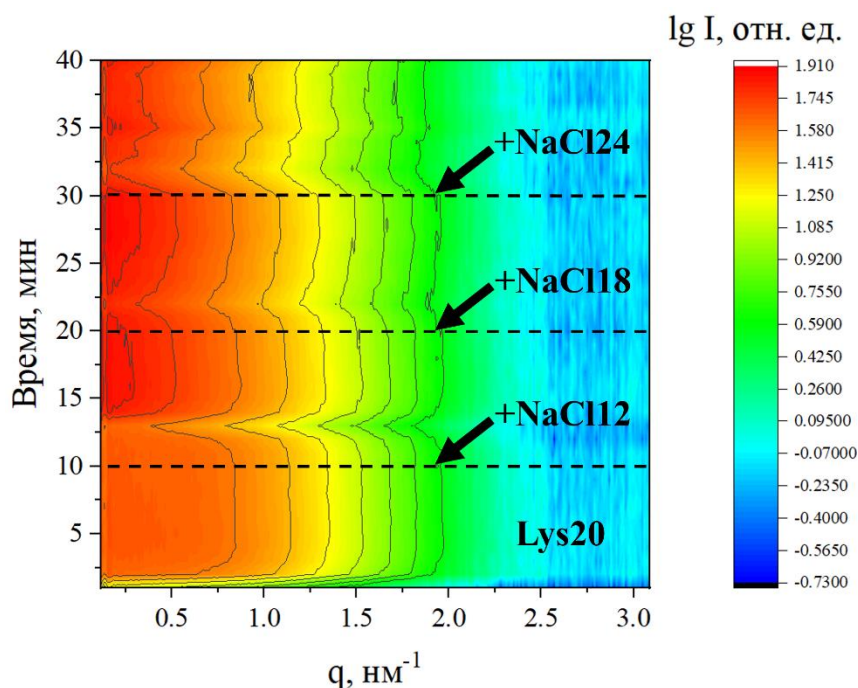


Рисунок 8 – Карта интенсивности рассеяния (цветом) для серии раствора лизоцима концентрации 20 мг/мл с разными концентрациями осадителя.

Использование плоскопараллельных рентгенопрозрачных окон позволило избавиться от артефактов на картинах МУРР, образующихся при использовании стандартных капилляров. Удалось добиться улучшения соотношения сигнал/шум получаемых кривых более чем на порядок, что дает возможность уменьшить время экспозиции в 5-10 раз без существенной потери качества кривых МУРР. Сокращение времени экспозиции, в свою очередь, позволяет проводить исследования динамики процессов, происходящих при заполнении ячейки. Полученные и описанные выше результаты позволили сформулировать второе положение, выносимое на защиту.

### **3.2. Контроль радиационных повреждений образцов при проведении малоугловых экспериментов**

Поскольку высокоинтенсивное рентгеновское излучение на станции «БиоМУР» является ионизирующим, важно проводить контроль изменений структуры образца под воздействием пучка. Оптимальной стратегией проведения неразрушающего эксперимента на станции «БиоМУР» будет являться подготовка отдельной пробы образца для проведения приоритетного контроля изменения структуры перед основным исследованием с целью определения максимально возможного времени экспозиции. Такое исследование было проведено для всех рассмотренных в работе тестовых белков (лизоцима и альбумина), а также для некоторых других образцов, предоставленных пользовательскими группами (белка ИНФ, аптамера к тромбину, раствора дигидрофосфата калия). Наименее стойким к радиационным повреждениям образцом оказался белок ИНФ – рост  $R_g$  для него начинается уже при экспозиции более 3 минут. Остальные образцы могут выдерживать непрерывное облучение на эксперименте в течение более чем 30 минут.

### **3.3. Развитие методики обработки малоугловых данных применительно к полидисперсным системам невзаимодействующих частиц**

Одним из важных методических аспектов данной работы является расширение возможностей быстрой обработки данных от полидисперсных

систем. Для работы с такими системами ранее уже был разработан ряд программ, таких как GNOM, MIXTURE, POLYMIX, однако эффективность их работы зачастую зависит от выбора начального приближения.

В отличие от монодисперсных систем, где распределение расстояний между парами частиц представляет собой простой Фурье-образ интенсивности рассеяния, здесь для описания  $D_k(R)$  используется распределение Шульца:

$$D(R) = \frac{1}{R_0} (z + 1)^{z+1} \frac{1}{\Gamma(z+1)} \left(\frac{R}{R_0}\right)^z \exp\left(-\frac{(z+1)R}{R_0}\right), \quad (1)$$

где  $R_0$  – среднее значение размера частицы. В качестве  $z$  обозначено выражение  $\left(\frac{R_0}{\Delta R}\right)^2 - 1$ , в котором  $\Delta R$  – дисперсия распределения Шульца.

В основе предлагаемого подхода лежит тезис о том, что в отсутствие межчастичного взаимодействия и без учета дисперсии зависимость интенсивности от вектора рассеяния для исследуемого вещества в приближении малых углов может быть сведена к простому экспоненциальному приближению (Гинье). При построении в координатах Кратки  $I_s^2(s)$  график кривой МУРР для такой системы должен иметь четко выраженный максимум, положение которого и будет определять приближенную оценку для размера частицы:

$$I_s^2 = I_0 s^2 \exp\left(-\frac{s^2 R_0^{*2}}{5}\right); \quad (2)$$

Из соотношения радиуса Гинье и радиуса шара [6] следует:

$$R_0^* = R_g^* \sqrt{5/3}. \quad (3)$$

$$s_{max} R_0^* = \sqrt{5}. \quad (4)$$

Итак, из (4) можно определить размер  $R_0^*$ , который и будет являться стартовым значением для работы программы. Дисперсию размера  $\Delta R$  можно также оценить при помощи предлагаемого подхода – следует приравнять интенсивность рассеяния в модели с распределением Шульца (1) с номинальным средним параметром распределения  $R_0$  к интенсивности рассеяния в экспоненциальном приближении (2), зависящим от размера  $R_0^*$ .

Теперь для простоты введем новое обозначение  $z_1 = z + 1$ . Разложим интенсивности рассеяния в ряд Тейлора до второго члена. Получим:

$$1 - \frac{(z_1+3)(z_1+4)}{z_1^2} \times \frac{s^2 R_0^2}{5} = 1 - \frac{s^2 R_0^{*2}}{5}; \quad (5)$$

$$\frac{(z_1+3)(z_1+4)}{z_1^2} = \alpha = \left(\frac{R_0^*}{R_0}\right)^2 > 1; \quad (6)$$

$$(\alpha - 1)z_1^2 - 7z_1 - 12 = 0. \quad (7)$$

Выражение (7) представляет собой квадратное уравнение, одно из решений которого даст оценочное значение  $z_1$ , а следовательно, и  $\Delta R_0$ .

В качестве модельных систем для проверки корректности работы предложенного подхода были выбраны растворы кремнезольей Ludox TM-50 (50% SiO<sub>2</sub>, 0.3% Na) и SM (30% SiO<sub>2</sub>, 0.2% Na) концентрации 0.5 мг/мл. Расстояние образец-детектор составляло приблизительно 2500 мм, время экспозиции – 600 с. При обработке данных использовались программы GNOM и POLYMIX, в которые подставлялись найденные по графикам и из формул (1)-(7) стартовые параметры. Результаты работы программ приведены в таблице 3.

Таблица 3. Параметры компонентов распределений, рассчитанные в программах GNOM (GN) и POLYMIX (PMX).

№	R <sub>0</sub> , нм	W, % (GN)	W, % (PMX)	R, нм (GN)	R, нм (PMX)	σ, нм (GN)	σ, нм (PMX)
TM50							
1	13.3	32.8	37.0	<b>11.5</b>	<b>11.4</b>	1.56	1.44
2		58.9	57.6	<b>13.1</b>	<b>13.2</b>	1.19	1.03
3		8.3	5.4	25.9	33.7	2.07	0.95
Rf	GNOM: 8.88·10 <sup>-5</sup> POLYMIX: 1.91·10 <sup>-4</sup>						
SM							
1	7.14	73	60	<b>5.4</b>	<b>5.5</b>	1.4	1.4
2		27	40	<b>8.8</b>	<b>8.8</b>	6.4	6.8
Rf	GNOM: 1.85·10 <sup>-4</sup> POLYMIX: 1.64·10 <sup>-4</sup>						
SM-TM50 (1:1)							
1	5.13	36.2	26.6	<b>5.4</b>	<b>5.4</b>	1.4	1.0
2		2.5	15.6	<b>8.4</b>	<b>8.8</b>	0.6	2.3
3	13.1	22.2	51.4	<b>11.5</b>	<b>12.8</b>	1.4	1.3
4		33.4	4.1	<b>13.3</b>	24.5	1.2	2.1
5		5.7	2.3	25.3	38.6	2.2	4.9
Rf	GNOM: 5.19·10 <sup>-5</sup> POLYMIX: 9.16·10 <sup>-5</sup>						

В результате применения данного подхода программы отработали похожим

образом, дав одинаковые значения максимумов распределений с очень низким значением R-фактора, а также получили распределения для смеси, максимумы которого соответствуют максимумам распределений для отдельных систем. Таким образом, показана корректность работы известных программ обработки полидисперсных систем с использованием предложенного алгоритма. Полученные и описанные выше результаты позволили сформулировать третье положение, выносимое на защиту.

#### **Глава 4. Экспериментальные результаты, демонстрирующие возможности созданной малоугловой станции на источнике СИ.**

В данной главе приведены результаты некоторых научных экспериментов, выполненных в ходе работы по реализации, отработке и совершенствованию методики МУРР на Курчатовском источнике СИ. Так, применительно к монодисперсным системам в растворах важным аспектом работы с малоугловыми данными является выяснение олигомерного состояния образца для корректной интерпретации структуры макромолекулы. С этой целью было проведено исследование конформаций белка BSA в зависимости от температуры, pH и ионной силы раствора. Было показано, что соотношения мономеров и димеров для различных концентраций белка могут быть вычислены при анализе функций  $p(r)$ , построенных с учетом структурного фактора взаимодействия.

Дальнейшее развитие работа по изучению процессов олигомеризации получила при проведении исследований начальной стадии кристаллизации как белков, так и неорганических молекул совместно с ФНИЦ «КиФ» РАН – было сделано предположение, что процессу кристаллизации предшествует стадия олигомеризации вещества в перенасыщенном растворе. Действительно, при добавлении в исходный раствор с веществом (в одной из работ изучался процесс кристаллизации лизоцима, в другой – дигидрофосфата калия, или KDP) осадителя, вызывающего в дальнейшем кристаллизацию, происходило заметное изменение формы кривой, рост радиуса Гинье и максимального размера частиц в распределении по расстояниям. В результате данных исследований было

установлено, что в обоих случаях элементарным кластером, образующим кристалл, является структурный блок из восьми молекул, то есть октамер.

Зачастую метод МУРР не является самостоятельным и в случае, когда исследователи имеют дело с новым неизвестным ранее веществом, может использоваться для подтверждения и уточнения результатов, полученных другими методами. Серия исследований, проводившихся совместно с группой из Красноярского научного центра СО РАН, заключалась в отработке и внедрении методики МУРР в последовательный алгоритм синтеза и отбора наиболее реакционноспособных аптамеров к различным белкам-патогенам. Суть алгоритма заключается в том, что предварительно синтезируются несколько различных аптамеров – ДНК-подобных структур, способных присоединяться селективно к нужному белку. Для них рассчитываются модели потенциалов взаимодействия на основе имеющейся информации о химических связях в структуре. Далее производятся измерения МУРР, строятся распределения по расстояниям и трехмерные модели, которые затем сравниваются с результатами теоретического моделирования. На рисунке 9 приведены результаты работы такого подхода применительно к аптамеру RE31 к тромбину, который является активным компонентом крови человека и играет важную роль в процессе ее свертывания.

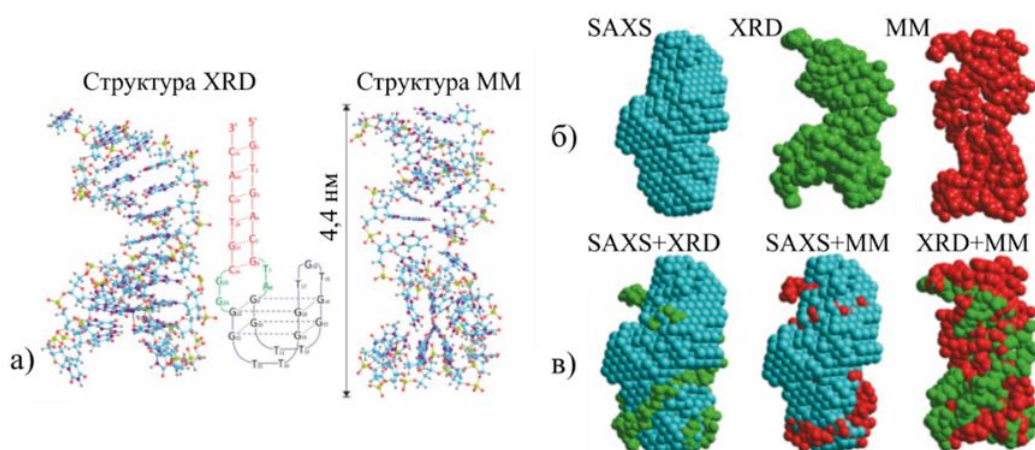


Рисунок 9 – Структуры аптамера RE31, полученные методами рентгеновской дифракции (XRD) и молекулярного моделирования (MM) (а), трехмерные модели (б), попарное сравнение трех различных моделей (в).

Количественным показателем точности сравнения данных различных методов выступает параметр  $\chi^2$  – значение невязки между экспериментальной и расчетной кривой МУРР от модели. Для сравнения SAXS+MM параметр  $\chi^2$  оказался равным 5.279, для SAXS+XRD – 5.851, а для XRD+MM – 6.317, что является приемлемым показателем. Таким образом, в результате эксперимента удалось получить достаточно точную модель аптамера, подтвержденную другими экспериментальными и расчетными методиками.

С использованием описанного алгоритма был подобран наиболее реакционноспособный аптамер к связующему домену (RBD) белка коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. На рисунке 10 показаны графики кривых МУРР и распределения по расстояниям для аптамера Apt31, единственного образовавшего стабильный комплекс с целевым белком.

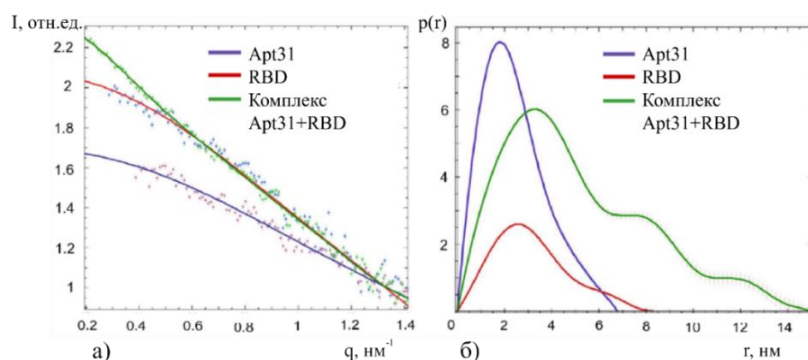


Рисунок 10 – Кривые МУРР аптамера к RBD с 31 нуклеотидом, самого белка и их комплекса (а), функции распределения по расстояниям (б).

Рассчитанные структурные параметры: для аптамера – ширина около 2 нм, длина 6.0 нм,  $R_g$   $1.77 \pm 0.07$  нм.; для белка RBD –  $R_g$   $2.48 \pm 0.05$  нм,  $D_{\max} = 8.3 \pm 0.1$  нм; для комплекса  $R_g$   $3.42 \pm 0.05$  нм,  $D_{\max} = 15 \pm 0.1$  нм, что соответствует сумме максимальных размеров для аптамера и RBD. Таким образом, можно утверждать, что аптамер к белку RBD коронавируса образует стабильный с ним комплекс и поэтому рассматривается как наиболее перспективный для создания эффективного средства диагностики и лечения.

Существенным достоинством станции «БиоМУР» является возможность исследования широкого спектра образцов в различном фазовом состоянии и

различной формы, достигнутая за счет проектирования универсального держателя образца. В частности, оказалось возможным проводить эксперименты с механическим воздействием на образцы биосовместимого полимера – полилактида (ПЛА). Важным показателем накопления усталости в таких полимерах, приводящей к их разрушению, является процесс формирования крейзов – механических дефектов, связанных с изменением упаковки полимера в слое материала [11]. Эксперименты проводились при расстоянии образец-детектор 2500 мм и при временах экспозиции 15-60 секунд. Рентгенограммы образцов исходного ПЛА и растянутого на воздухе представлены на рисунке 11.

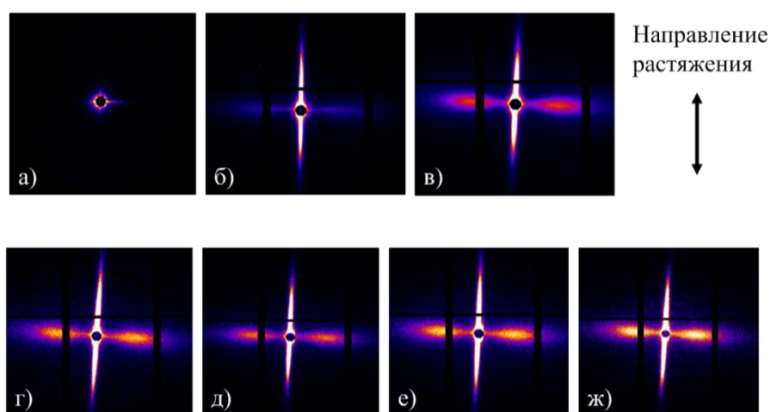


Рисунок 11 – Рентгенограммы для ПЛА – исходный образец (а), относительное удлинение 4% (б), 8.5% (в), 12.5% (г), 17% (д), 21% (е), 25% (ж).

Далее для кривых, полученных интегрированием в экваториальном направлении, рассчитывался инвариант Порода, представляющий собой площадь под графиком в координатах  $q \cdot I(q)$ , и затем был построен график зависимости этого инварианта в зависимости от степени удлинения, показанный на рисунке 12.

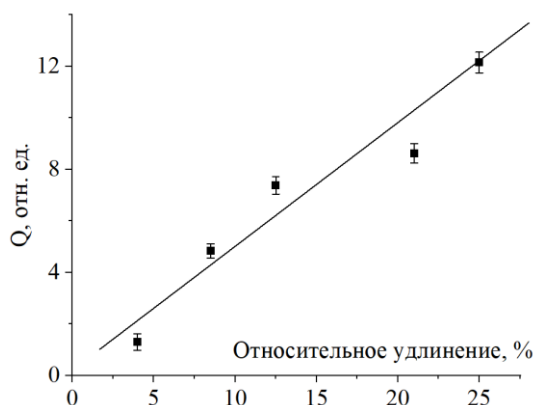


Рисунок 12 – Инвариант Порода в зависимости от деформации ПЛА.



Данный график демонстрирует линейную зависимость, причем экстраполирующуюся к нулю – это говорит о том, что при деформации полилактида образуются и линейно увеличиваются в объеме так называемые крейзы, или продольные дефекты его структуры, что хорошо согласуется с уже известными литературными данными.

Полученные и описанные выше результаты позволили сформулировать четвертое и пятое положения, выносимые на защиту.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые в России спроектирована и создана универсальная станция на источнике синхротронного излучения для проведения неразрушающих исследований широкого спектра объектов с неупорядоченной или частично упорядоченной структурой (растворов белков, полимеров и наночастиц, пленок, гелей, порошков и др.) методом малоуглового рентгеновского рассеяния сериями по 5-20 образцов. Поток фотонов на образце  $1.86 \times 10^{10}$  фот/с. На станции применены нерассеивающие блоки щелей с точностью позиционирования 10 мкм и вакуумные окна из слюды толщиной 40 мкм, что позволяет добиться соотношения сигнал-шум на уровне 0.1% при времени экспозиции 300 с.
2. Разработана новая конструкция микрофлюидной ячейки (габариты 30x15x6мм, диаметр рабочего окна 3 мм, рабочий объем 7 мкл, сечение подводящих каналов 30 мкм<sup>2</sup>) с плоскопараллельными окнами, использование которой позволяет проводить исследования динамики процессов в растворах.
3. С использованием оптимизированных методов анализа данных рассеяния от полидисперсных систем, основывающихся на предварительной оценке стартовых параметров, определены распределения по размерам наночастиц в растворах кремнезольей, предложенных в качестве размерных стандартов для диапазона 5 – 30 нм.

4. С использованием комбинации методов МУРР и молекулярного моделирования впервые в мире получена трехмерная пространственная модель структуры аптамера (радиус инерции  $1.77 \pm 0.07$  нм, максимальный размер  $8.3 \pm 0.1$  нм, объем  $33.91 \pm 0.27$  нм<sup>3</sup>), связывающегося с белком-шипом коронавируса, а также структуры их бинарных комплексов.
5. Благодаря расширенному функционалу новой станции проведен анализ механизмов деформации пленок полилактида при растяжении.

#### ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Peters G. S.**, Zakharchenko O. A., Konarev P. V., Karmazikov Y. V., Smirnov, M. A. Zabelin A. V., Mukhamedzhanov E. H., Veligzhanin A. A., Blagov A. E., & Kovalchuk M. V. The small-angle X-ray scattering beamline BioMUR at the Kurchatov synchrotron radiation source. //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. – 2019. – Vol. 945. – P. 162616.
2. **Peters G. S.**, Gaponov Yu. A., Konarev P. V., Marchenkova M. A., Ilina K. B., Volkov V. V., Pisarevskiy Yu. V. & Kovalchuk, M. V. Upgrade of the BioMUR beamline at the Kurchatov synchrotron radiation source for serial small-angle X-ray scattering experiments in solutions //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. – 2022. – Vol. 1025. – P. 166170.
3. Marchenkova M. A., Chapek S. V., Konarev P. V., Ilina K. B., **Peters G. S.**, Pisarevsky Y. V., Shishkov V. A., Soldatov A. V. & Kovalchuk, M. V. 3D Printed Microfluidic Cell for SAXS Time-Resolved Measurements of the Structure of Protein Crystallization Solutions //Crystals. – 2023. – Vol. 13. – №. 6. – P. 938.
4. Амарантов С. В., **Петерс Г. С.** Выбор стартовых значений параметров распределений частиц по размерам для их расчета по данным малоуглового рентгеновского рассеяния //Кристаллография. – 2023. – Т. 68. - №. 4. – С. 514-530.
5. Molodenskiy D. S., Shirshin E. A., **Peters G. S.** et al. Thermally induced conformational changes and protein–protein interactions of bovine serum albumin in

- aqueous solution under different Ph and ionic strengths as revealed by SAXS measurements //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2017. – Vol. 19. – №. 26. – P. 17143-17155.
6. Kovalchuk M. V., Blagov A. E., **Peters G. S.** et al. Investigation of the initial crystallization stage in lysozyme solutions by small-angle X-ray scattering //Crystal Growth & Design. – 2016. – Vol. 16. – №. 4. – P. 1792-1797.
  7. Kovalchuk M. V., Alekseeva O. A., Blagov A. E., Konarev P. V., **Peters G. S.** et al. Investigation of the structure of crystal-forming solutions of potassium dihydrogen phosphate K (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)(KDP type) on the basis of modeling precursor clusters and according to small-angle X-ray scattering data //Crystallography Reports. – 2019. – Vol. 64. – №. 1. – P. 6-10.
  8. Tomilin F. N., Moryachkov R. V., Zabluda V. N., **Peters G. S.** et al. Four steps for revealing and adjusting the 3D structure of aptamers in solution by small-angle X-ray scattering and computer simulation //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2019. – Vol. 411. – №. 25. – P. 6723-6732.
  9. Mironov V., Shchugoreva I. A., Artyushenko P. V., Zamay T. N., Moryachkov R. V., Zabluda V. N., **Peters G. S.** et al. Structure and Interaction Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers //Chemistry–A European Journal. – 2022. – Vol. 28. – №. 12. – P. e202104481.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Korneev V. N. et al. Development of X-ray equipment for small-angle investigations of biological nanostructures on synchrotron radiation //Glass Physics and Chemistry. – 2008. – Vol. 34. – №. 4. – P. 501-508.
- [2] Korneev V. N. et al. FRAKS camera for small angle monochromatic diffractometry of synchrotron X radiation //Pribory i Tekhnika Eksperimenta. – 1984. – P. 180-183.
- [3] Mogilevskiy L. Y. et al. Small-angle X-ray diffractometer with single coordinate detector //Crystallography. – 1984. – Vol. 29. – P. 587-591.

- [4] Blanchet C. E. et al. Instrumental setup for high-throughput small-and wide-angle solution scattering at the X33 beamline of EMBL Hamburg //Journal of Applied Crystallography. – 2012. – Vol. 45. – №. 3. – P. 489-495.
- [5] Sjöblom P. et al. Motion control system of MAX IV Laboratory soft x-ray beamlines //AIP Conference Proceedings. – AIP Publishing LLC, 2016. – Vol. 1741. – №. 1. – P. 030045.
- [6] Gianoncelli A. et al. Current status of the TwinMic beamline at Elettra: a soft X-ray transmission and emission microscopy station //Journal of Synchrotron radiation. – 2016. – Vol. 23. – №. 6. – P. 1526-1537.
- [7] Kikhney A. G. et al. SASBDB: Towards an automatically curated and validated repository for biological scattering data //Protein Science. – 2020. – Vol. 29. – №. 1. – P. 66-75.
- [8] Konarev P. V. et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis //Journal of applied crystallography. – 2003. – Vol. 36. – №. 5. – P. 1277-1282.
- [9] Franke D. et al. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions //Journal of applied crystallography. – 2017. – Vol. 50. – №. 4. – P. 1212-1225.
- [10] Svergun D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria //Journal of applied crystallography. – 1992. – Vol. 25. – №. 4. – P. 495-503.
- [11] Stoclet G. et al. In-situ SAXS study of the plastic deformation behavior of polylactide upon cold-drawing //Polymer. – 2014. – Vol. 55. – №. 7. – P. 1817-1828.