

# РЕНТГЕНОВСКИЕ ЛАЗЕРЫ НА СВОБОДНЫХ ЭЛЕКТРОНАХ И НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОБЪЕКТОВ НАНО- И МИКРОМИРА

Д.О. Синицын<sup>\*1</sup>, В.Ю. Лунин<sup>2</sup>, А.Н. Грум-Гржимайло<sup>3</sup>,  
Е.В. Грызлова<sup>3</sup>, Н.К. Балабаев<sup>2</sup>, Н.Л. Лунина<sup>2</sup>, Т.Е. Петрова<sup>2</sup>,  
К.Б. Терешкина<sup>1</sup>, Э.Г. Абдулнасыров<sup>1</sup>, А.С. Степанов<sup>1</sup>,  
Ю.Ф. Крупянский<sup>\*\*1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической физики имени Н.Н. Семенова, Российская академия наук

<sup>2</sup>Институт математических проблем биологии, Российская академия наук

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скobelьцына  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

\*d\_sinitsyn@mail.ru, \*\*yufk@chph.ras.ru

Поступила 12.06.2013

В работе рассматриваются свойства новых источников излучения – рентгеновских лазеров на свободных электронах. Описаны характеристики создаваемых ими сверхмощных ультракоротких рентгеновских импульсов, особенности дифракционных экспериментов на этих приборах и новые возможности, открываемые ими в области кристаллографии. В результате проведенного моделирования рассеяния импульсов, характерных для рентгеновских лазеров, на нанокристаллах биологических макромолекул, с учетом процессов радиационного повреждения образца, получены оценки максимальных разрешений, которые могут быть достигнуты при различных параметрах экспериментального оборудования и изучаемых кристаллов. Эти результаты демонстрируют существенное расширение возможностей рентгеноструктурного анализа с использованием рентгеновских лазеров по сравнению с синхротронами третьего поколения.

УДК 539.26

## Введение: рентгеновские лазеры расширяют возможности исследований методом рентгеновской дифракции

Рентгеновская дифракция является первым и на данный момент одним из наиболее плодотворных методов получения информации о структуре вещества на атомном уровне. Возможности этого метода последовательно расширялись с появлением новых

источников рентгеновского излучения. Создание более мощных синхротронов делало доступным изучение всё более широкого круга молекул, в том числе таких, из которых удается вырастить лишь малые, слабо рассеивающие кристаллы (таковы, например, многие мембранные белки, а также крупные молекулярные комплексы). Однако до сих пор интенсивность излучения синхротронов недостаточна для исследования наноразмерных кристаллов макромолекул и тем более одиночных молекул и их комплексов, что является крайне желательным для изучения плохо кристаллизуемых объектов и для расшифровки структур объектов в растворе. Появление в последние годы рентгеновских лазеров на свободных электронах (РЛСЭ) позволило значительно приблизиться к решению этих проблем.

В 2009 году начал работу первый лазер на свободных электронах в жестком рентгеновском диапазоне Linac Coherent Light Source (LCLS) в Стэнфорде, США, [1], открыв четвертое поколение источников синхротронного излучения в рентгеновской области. Развитие приборов такого рода может открыть существенно новые возможности для визуализации объектовnano- и микромира с помощью рентгеновской дифракции. Сочетание беспрецедентной мощности импульсов (на 9 порядков превышающей мощность предшествующих источников) и их фемтосекундной ( $1 \text{ фс} = 10^{-15} \text{ сек}$ ) длительности позволило регистрировать дифракционные картины до наступления более медленных процессов радиационного повреждения. Это дало возможность успешно применять дозы облучения, в десятки раз превышающие максимально допустимые дозы для кристаллов на современных синхротронах, что позволяет получать высокие разрешения на кристаллах меньшего размера, чем изучаемые на синхротронах. Тем самым, заложены основы нанокристаллографии – исследования нанокристаллов макромолекул на рентгеновских лазерах для определения трехмерных молекулярных структур.

Целью настоящей работы является обзор основных явлений и процессов, связанных с применением РЛСЭ (таких как проблемы кристаллизации макромолекул, дифракция, радиационное повреждение), сравнение характеристик РЛСЭ и синхротронов, а также моделирование электронного повреждения образцов и его влияния на дифракцию на нанокристаллах для определения доступных диапазонов разрешений при различных значениях параметров образца и экспериментального оборудования. Результаты этого моделирования характеризуют предельные возможности РЛСЭ в области нанокристаллографии.

В дальнейших разделах мы описываем объекты, изучаемые с помощью рентгеноструктурного анализа, и проблемы получения белковых кристаллов требуемого качества; кратко характеризуем принцип действия РЛСЭ и сравниваем их характеристики с синхротронами; анализируем проблему радиационного повреждения образцов и возможность уменьшить его влияние с помощью РЛСЭ; описываем результаты моделирования электронного повреждения и приводим оценки максимальных детектируемых разрешений для достигнутых и перспективных значений параметров рентгеновских импульсов и детекторов, на основе чего проводим сравнение возможностей синхротронов с существующими и перспективными РЛСЭ в области расшифровки трехмерных структур макромолекул.

## **Многие макромолекулы представляют существенные трудности для рентгеноструктурного анализа**

Несмотря на значительные успехи структурной биологии в установлении трехмерной организации атомов многих важнейших биологических макромолекул, количество белков с известной трехмерной структурой составляет лишь небольшую долю от всех белков с известной последовательностью аминокислот (на 2009 г. в [2] эта доля оценена в 6%). При этом в классе мембранных белков, составляющих более 30% всех белков типичной клетки и на которые направлено более 60% всех лекарств [3], на данный момент (май 2013 г.) депонированы в банк PDB всего около 615 структур (из более 84 ты-

сяч всех белковых структур) для около 220 различных мембранных белков (из более 42 тысяч различных охарактеризованных белков). Тем самым, среди белков с известной трехмерной структурой мембранные белки составляют всего порядка 0.5%, что резко расходится с важностью их исследования. Такая ситуация связана со значительными трудностями, имеющимися на пути структурного исследования многих молекулярных объектов, в особенности мембранных белков, а также крупных молекулярных комплексов. Так, недавно полученная структура G-белок сопряженных рецепторов (первым из которых был охарактеризован рецептор адреналина) потребовала целого десятилетия усилий и была отмечена Нобелевской премией 2012 года.

Для традиционной схемы рентгеноструктурного анализа одной из главных сложностей является получение достаточно крупных кристаллов, способных рассеивать требуемое количество рентгеновского излучения на большие углы для получения дифракционной картины высокого разрешения. Выращивание белковых кристаллов обычно требует тонкого подбора множества условий кристаллизации, причем во многих случаях наука не достигла детального понимания процесса и требуется трудоемкий перебор различных комбинаций параметров. Однако даже после оптимизации условий кристаллы многих белков не растут больше определенного размера, часто остающегося недостаточным для дифракционных экспериментов на синхротронах. Ситуация также существенно осложняется для объектов, дающих кристаллы с крупной элементарной ячейкой, таких как большие молекулярные комплексы, представляющие огромный интерес для понимания взаимодействия макромолекул в процессе выполнения своих функций. Такие кристаллы при том же размере имеют гораздо меньшее число ячеек, чем кристаллы малых и средних белков, что приводит к низкой интенсивности рассеяния.

Наконец, неясно, удастся ли вообще закристаллизовать основную массу представляющих интерес белков. Имеющиеся программы, автоматически оценивающие кристаллизуемость белков по первичной последовательности, используя аналогию с уже изученными структурами, характеризуют многие белки как очень трудно кристаллизуемые. Так, сервер XtalPred [4] характеризует около 40% белков бактерии кишечной палочки как очень трудно кристаллизуемые. В такой ситуации возникает острая потребность в поиске новых возможностей структурного анализа. Одной из них является дифракция на нанокристаллах и одиночных молекулах, надежду на реализацию которой дают недавние успехи в создании и эксплуатации РЛСЭ.

### **Рентгеновский лазер генерирует импульсы, в миллиарды раз более мощные, чем излучение синхротронов**

В основе РЛСЭ лежит конструкция ондулятора, предложенная в 1947 году В.Л. Гинзбургом [5], см. также [6, 7]. Это устройство, в котором имеется ряд магнитов, расположенных вдоль прямой и ориентированных перпендикулярно к ней, с чередующимся направлением поля. Попадая в канал с таким магнитным полем, электроны начинают совершать волнобразное движение, испуская излучение соответствующей частоты. На этом принципе основана генерация излучения в синхротронах 3-го поколения.

Излучение в ондуляторе может воздействовать на движущиеся в нем электроны, ускоряя или замедляя их в зависимости от фазы колебаний и осуществляя тем самым продольную модуляцию электронной плотности в пучке [8, 9]. При определенных условиях это может приводить к индуцированному излучению электронов, усиливающему уже существующее в ондуляторе излучение. В 1970-х годах этот эффект был реализован в режиме так называемого слабого усиления (“low gain”) [10], см. также [18].

Комбинация указанного эффекта с резонатором из двух зеркал по обе стороны ондулятора позволила добиваться значительного усиления и когерентности и создать первые лазеры на свободных электронах (ЛСЭ) в диапазонах длин волн, для которых существуют эффективные зеркала. Так, в Новосибирске создан ЛСЭ в терагерцовом

диапазоне с уникальными характеристиками [11-13]. С его помощью успешно проводятся исследования наноразмерных объектов и явлений [14,15].

В случае жестких рентгеновских лучей, однако, эффективные зеркала отсутствуют, ввиду чего потребовалась другая схема получения когерентного излучения. Для этого был разработан принцип самоусиленной спонтанной эмиссии (Self-Amplified Spontaneous Emission, SASE, [16,17] см. также [18]). Он состоит в том, что в достаточно длинном ондуляторе воздействие генерируемого излучения на электроны приводит к сильной продольной модуляции электронной плотности (сильное усиление, “high gain” [18]), вплоть до разбиения электронного пучка на микросгустки (*microbunches*), движущиеся (приблизительно) в одной фазе. Это делает излучение электронов всего сгустка когерентным. Можно показать, что в такой ситуации интенсивность излучения становится пропорциональной  $n^2$ , где  $n$  – число электронов в сгустке, в отличие от ондуляторов на синхротронах, для которых эта интенсивность пропорциональна  $n$ , [7]. Как следствие, в РЛСЭ достигается выигрыш в 9-10 порядков в пиковой мощности. Этот принцип и послужил основой для создания первых рентгеновских лазеров на свободных электронах: FLASH (Гамбург, Германия) в области мягкого рентгена (длина волны 4.1-45 нм) и LCLS в жестком и мягкому рентгеновском диапазонах (0.13-45 нм). Заметим, что воздействие света на электронные пучки, а именно рассеяние электронов на стоячих волнах света, обсуждалось еще в работе [19].

Несмотря на колоссальный скачок по пиковой мощности в лазерах на принципе самоусиленной спонтанной эмиссии по сравнению с синхротронами, получение дифракционной картины от одиночных молекул требует дальнейшего увеличения интенсивности импульсов. Кроме того, спектр излучения этих приборов существенно немонохроматичен. Одной из возможных модификаций рентгеновских лазеров, направленных на решение обеих этих проблем, является так называемый посев когерентности (*seeding*). Этот подход предполагает добавление в ондулятор монохроматического излучения, которое задает основную усиливаемую гармонику модуляции электронной плотности, в отличие от обычной схемы, где усиливается набор случайных флуктуаций, существовавших в электронном пучке на входе в ондулятор. Одной из реализаций этого принципа является так называемый само-посев (*self-seeding*, [20]), при котором электроны сначала проходят один ондулятор, а затем попадают во второй, причем излучение первого ондулятора подвергается монохроматизации и затем попадает во второй ондулятор, осуществляя в нем посев когерентности. Такая схема способна сделать излучение рентгеновских лазеров близким к монохроматическому и на 2-3 порядка повысить его интенсивность. Схемы посева когерентности уже реализованы на ЛСЭ мягкого рентгеновского диапазона [21], внедряются на LCLS [22] и, несомненно, станут неотъемлемым атрибутом РЛСЭ.

К настоящему времени введены в действие и используются в экспериментах в ВУФ диапазоне ЛСЭ FLASH (Гамбург, Германия, 2005) [23-25], SCSS (Япония, 2007) [26], FERMI (Триест, Италия, 2012) [21], а в жестком рентгеновском диапазоне LCLS (Стэнфорд, США, 2009) [27,1] и SACLA (Япония, 2012) [28,29]. В ближайшем будущем будет запущен РЛСЭ European XFEL (Гамбург, Германия, 2015); создается и планируется ряд других ЛСЭ, например, SwissFEL (Швейцария, 2017/2018) с двумя ондуляторными линиями, MAX IV Short Pulse Facility (Лунд, Швеция), готовятся вторые очереди существующих ЛСЭ (FLASH-2, LCLS-2, FERMI-2). Фокусировкой пучка фотонов РЛСЭ в объеме реакции при длине волны излучения 6-15 Å достигнута интенсивность  $10^{18}$  Вт/см<sup>2</sup> [30] с перспективой доведения до  $\sim 10^{22}$  Вт/см<sup>2</sup> при длине волны  $\sim 1$  Å. Налицо революционное развитие источников синхротронного излучения четвертого поколения. В табл. 1 приведены некоторые характеристики фотонных пучков, достигнутые на работающих ЛСЭ рентгеновского диапазона, а также планируемых к реализации на European XFEL.

Рентгеновское излучение лазеров на свободных электронах превосходит излучение синхротронов по ряду важных параметров, что делает возможными многие принципиально

**Таблица 1. Параметры существующих и строящегося рентгеновских лазеров на свободных электронах**

	LCLS	SACLA	European XFEL
Страна расположения	США	Япония	Германия
Год запуска	2009	2011	2015
Энергия фотонов (кэВ)	0.27-9.5	4.4-16.8	0.25-12.4
Длина волны излучения (Å)	1.3-45	0.7-2.8	0.5-60
Частота повторения импульсов (Гц)	120	60	27000
Длительность импульса (фс)	10-300	30	<100
Число фотонов в импульсе	$10^{12}-10^{13}$	$5 \cdot 10^{11}$	$10^{12}-10^{14}$

**Таблица 2. Каскад процессов радиационного повреждения**

Процесс повреждения	Фотоионизация (фотоэффект)	Эффект Оже	Вторичная ионизация (выбитыми электронами)	Движение атомов (ионов) вследствие ионизации
Время проявления от начала облучения	<1 фс	1-10 фс	0.1-10 фс	20-100 фс
Традиционный рентгеноструктурный анализ (время облучения: минуты)	Проявляется	Проявляется	Проявляется	Проявляется
Рентгеновский лазер на свободных электронах (время облучения: 1-десятки фс)	Проявляется	Частично проявляется	Частично проявляется	Слабо проявляется

новые исследования с их использованием. Приведем некоторые примеры новых процессов, обнаруженных в экспериментах с РЛСЭ.

Первые же измерения выхода ионов и спектров фотоэлектронов на ЛСЭ с атомами открыли нелинейные фотопроцессы в ВУФ и рентгеновском диапазонах [31,32], т.е. процессы с поглощением атомом двух и более фотонов. Так, в экспериментах с атомами ксенона и масс-спектрометрией образуемых ионов зарегистрирован выход ионов с кратностью ионизации до  $Xe^{36+}$  [33]. Это наибольшая кратность ионизации, когда-либо достигнутая под воздействием одиночного импульса. При облучении атомов неона фотонами с энергией 2 кэВ получены ядра неона с полностью ободранной электронной оболочкой [30]. Процесс происходит за несколько десятков фемтосекунд в виде последовательности элементарных актов "фотоионизация – распад Оже – фотоионизация – распад Оже – ...". Зарегистрировано усиление Ка-линий неона с длиной волны 1.46 нм при облучении РЛСЭ [34]. По-существу, это создание рентгеновских лазеров на атомных переходах, накачиваемых импульсами РЛСЭ. Монокроматичность и степень когерентности излучения таких лазеров обещают быть уникальными для этого диапазона, с захватывающей перспективой охвата рентгеновских переходов в других атомах, а также молекулах. Обнаружено, что под действием РЛСЭ на фемтосекундном временном масштабе образуются "полые" атомы со свободной К-оболочкой как в свободном состоянии [30], так и связанные в молекулах [35,36,31]. Тем самым продемонстрирован

большой потенциал исследований с РЛСЭ в новом разделе физики Оже-распада – Оже-спектроскопии двойных дырочных состояний. Двух- и трехфотонная двойная и тройная ионизация атомов под действием импульса ЛСЭ производится с интенсивностью, достаточной для измерения угловых распределений вылетающих в этих реакциях электронов (например, [37-40]). Плотность потока фотонов при этом такова, что за время фемтосекундного импульса синхротронного излучения положительно заряженные ионы не успевают разлететься из-за кулоновского отталкивания и тем самым преодолевается основное препятствие в экспериментах с положительно заряженными ионами – проблема создания мишени с достаточно высокой плотностью. Эти исследования формируют новое направление – фотоэлектронную спектроскопию положительно заряженных ионов. Под действием фемтосекундного импульса РЛСЭ наблюдалось опустошение электронных оболочек в молекуле [41] и, более того, проводился мониторинг происходящего при этом разлета молекулярных фрагментов [42,43]. При облучении больших кластеров ксенона (~11000 атомов) 150 фс импульсом РЛСЭ с интенсивностью до  $\sim 10^{17}$  Вт/см<sup>2</sup> получено убедительное указание на образование взрывающейся нанопlasмы [44], необычные свойства которой наблюдались в других экспериментах с кластерами на ЛСЭ [45-47]. Как показывают первые эксперименты, возможности РЛСЭ могут внести уникальный вклад в изучение морфологии микрометровых частиц вещества (аэрозолей) [48,49], которую исключительно трудно установить для таких частиц в естественном состоянии. Эти данные представляют большую ценность для токсикологии, климатологии, технологий с использованием аэрозолей. Фемтосекундные длительности импульсов РЛСЭ и аттосекундные периоды их несущей частоты позволяют в экспериментах типа накачка – зондирование (pump – probe) проследить эволюцию квантовых систем на сверхкоротких временах. Сейчас контролируемое временное разрешение задержки между импульсами РЛСЭ и оптическим лазером можно довести до нескольких фемтосекунд [50]. Схема накачка – зондирование опробована, с новыми результатами для фотоионизации и Оже-распада атомов и молекул, в нескольких экспериментах с комбинацией коротких импульсов ЛСЭ и оптического лазера (например, [51-53]), подтвержден принцип изучения фотоиндукционной динамики молекулы на поверхности на субпикосекундных временах [54].

Изучение всех этих, а также ряда других, не отмеченных выше явлений и процессов (см., например, [55]), было бы невозможным с синхротронными источниками предыдущих поколений, импульсы которых на много порядков менее интенсивны и длительность которых на много порядков больше.

С точки зрения рентгеновской дифракции одним из главных прорывов, осуществленных на РЛСЭ, является возрастание пиковой мощности на 9-10 порядков по сравнению с наиболее мощными современными синхротронами. Так, пиковая мощность лазера LCLS порядка 25 гигаватт. Это позволяет исследовать образцы гораздо меньшего размера, в частности, кристаллы размером в десятки или сотни нанометров вместо требовавшихся ранее образцов размером порядка микрометров. С развитием технологии рентгеновских лазеров может быть осуществлена также задача дифракции на одиночных молекулах. В литературе имеются различные оценки необходимой для этого пиковой мощности. Так, в докладе [56] приведено значение мощности 2 тераватта, сфокусированных в круге диаметром 100 нм. В статье [57] приводится требование  $10^{12}$  фотонов с энергией 8 кэВ в импульсе длительностью менее 5 фс, что соответствует мощности порядка 0.25 тераватт. В целом можно отметить недостаток подобных исследований условий, необходимых для измерения дифракции на одиночных молекулах и нанокристаллах – экспериментов, служивших одним из главных обоснований необходимости создания РЛСЭ. В настоящей работе, на основе моделирования дифракции с учетом радиационного повреждения, даются оценки необходимых интенсивностей импульсов для дифракции на нанокристаллах различного размера.

## Ультракороткие импульсы позволяют уменьшить радиационное повреждение

Помимо беспрецедентно высокой интенсивности, другой важной характеристикой излучения рентгеновских лазеров является импульсный характер их излучения, причем длительность импульсов составляет от нескольких фемтосекунд до сотен фемтосекунд. Это позволяет записывать дифракционные картины до наступления более медленных процессов радиационного повреждения, по принципу "дифракция до разрушения" ("diffraction before destruction", см. далее), что является одним из главных преимуществ РЛСЭ перед синхротронами.

Проблема радиационного разрушения кристаллов является одной из главных трудностей в традиционной схеме рентгеноструктурного анализа на синхротронах. Повреждение кристаллов в процессе рассеяния излучения ограничивает количество дифракционных картин, которые можно снять с одного и того же образца. Сбор набора данных с нескольких кристаллов также представляет трудности, связанные с совмещением интенсивностей рассеяния, собранных на разных образцах. Особенно остро проблема радиационного повреждения стоит для кристаллов с малым числом элементарных ячеек, которые слабо рассеивают рентгеновские лучи и поэтому требуют пропускания больших доз излучения.

Идея дифракции до разрушения возникает из анализа временного масштаба процессов радиационного повреждения. Дело в том, что в этом явлении участвуют несколько механизмов, каждый из которых имеет свое характерное время проявления (см. табл. 2).

Наиболее быстрым компонентом радиационного повреждения является фотоионизация, которая начинает проявляться на временах меньше одной фемтосекунды. В процессе фотоионизации рентгеновские электроны выбивают электроны из атомов образца (фотоэлектроны). Для биомолекулярных объектов выбиваются преимущественно электроны из внутренней К-оболочки атомов C, N, O. Это приводит, с одной стороны, к изменению структуры атома и ее дальнейшей перестройке, а с другой, к испусканию высокоэнергетического электрона, который может вызвать ионизацию других атомов в образце (вторичная ионизация, см. далее).

Атом, подвергшийся фотоионизации, может впоследствии претерпеть Оже-распад, в результате которого дырка в К-оболочке заполняется электроном с более высокой орбитали, а потерянная им энергия передается другому электрону (Оже-электрону), который в результате этого вылетает из атома. Времена жизни дырки в К-оболочке по отношению к Оже-распаду – 11.1 фс (C), 9.3 фс (N) и 6.6 фс (O), [58].

Далее, любой свободный электрон в образце при столкновении с атомом может вызвать в нем так называемую вторичную ионизацию (secondary ionization, impact ionization), в результате которой часть энергии налетающего электрона передается одному из электронов атома, который в результате вылетает из него (вторичный электрон). В качестве налетающих могут выступать фотоэлектроны, Оже-электроны, а также сами вторичные электроны, что приводит к каскадам вторичной ионизации. Численное моделирование в работах [59, 60] показало, что эти каскады развиваются на временах от нескольких фемтосекунд до десятков фемтосекунд.

Наконец, на еще более длительных временах порядка 20-100 фс происходит существенное смещение ядер атомов. Если интенсивность импульса такова, что произошла значительная ионизация образца, то ионизованные атомы начинают разлетаться вследствие кулоновского отталкивания. Кроме того, энергия свободных электронов в результате неупругих столкновений передается атомам, что приводит к разогреванию образца. Все это ведет к значительным смещениям атомов из их равновесных положений в кристалле. В случае традиционного рентгеноструктурного анализа ионизация приводит к химическим процессам, таким как разрыв связей и разупорядочивание соответствующих атомов, к смещению элементов структуры молекулы.

Особенность дифракционного эксперимента на РЛСЭ состоит в том, что огромная энергия поглощается образцом за очень короткий промежуток времени – фемтосекунды или десятки фемтосекунд. Поглощенного количества энергии достаточно, чтобы образец превратился в плазму и взорвался. В то же время, очень маленькая длительность импульса на таких источниках и его высокая мощность позволили выдвинуть и активно разрабатывать идею возможности "дифракции до разрушения" [60-64]. Согласно этой идеи дифракционную картину от большого единичного макромолекулярного комплекса, вируса или нанокристалла можно получить до того, как образец взорвется под действием сверхмощного импульса. Эксперимент организуется таким образом, что биологические образцы подаются в струе один за другим, и от каждого образца получается одна дифракционная картина. Имеются работы, в которых радиационное разрушение образцов коротким импульсным излучением изучается теоретически и с помощью численного моделирования [59-61,63], а также работы, в которых возможность "дифракции до разрушения" демонстрируется в дифракционных экспериментах с конкретными структурами [65-69]. Достигнутая в настоящее время на установке LCLS длительность импульсов 10 фс позволяет избежать существенного движения ядер, а также уменьшить влияние вторичной ионизации и эффекта Оже. Планируемая к реализации на лазере European XFEL длительность импульсов в 2 фс позволит добиться еще меньших повреждений.

Здесь следует отметить также идею "самоостанавливающейся дифракции" (self-terminating diffraction), разработанную в работе [70], согласно которой даже в случае более длительных импульсов в сотни фемтосекунд могут быть получены качественные дифракционные картины. Предлагаемое авторами объяснение состоит в том, что по мере накопления повреждений кристалла в процессе импульса брэгговская дифракция на нем прекращается, что приводит к сокращению эффективной длительности импульса, не искажая ранее накопленную картину. Данный принцип предлагается в качестве объяснения действительно наблюдавшихся в этом исследовании качественных дифракционных картин фотосистемы-I с максимальным разрешением 7.6 Å, полученных с помощью импульсов длительностью до 300 фс. Подтверждение этой концепции может ослабить требования по длительности импульсов, переместив акцент развития рентгеновских лазеров главным образом на повышение пиковой мощности, по крайней мере в области кристаллографии.

Заметим, что с точки зрения упругого рассеяния рентгеновских лучей полезно различать два типа повреждений: электронное повреждение, связанное с изменением структуры электронных оболочек атомов, и повреждение, связанное с разупорядочиванием положений ядер атомов в кристалле. Поскольку последнее в значительной мере преодолевается на рентгеновских лазерах за счет фемтосекундной длительности импульсов, в данной работе мы фокусируемся на электронном повреждении. Его влияние на дифракцию состоит, во-первых, в искажении формы электронной плотности атомов и, соответственно, в изменении формы атомных формфакторов рассеяния, используемых для расчета интенсивности рассеяния на кристалле в различных направлениях (подробнее см. ниже). Во-вторых, ионизация приводит к общему уменьшению рассеивающей способности атомов и снижению интенсивности брэгговских пиков.

Электронное повреждение и его влияние на рассеяние на атоме углерода исследовалось в работе [71], где был использован метод скоростных уравнений для описания ионизации атомов. Случай дифракции на некристаллическом образце (вирусе) изучался в работе [72], где была обнаружена существенная потеря качества дифракционных картин при высоких интенсивностях излучения. В работе [73] была исследована дифракция на кристалле кремния в рамках модели электронного повреждения с достаточно подробным учетом вторичной ионизации и динамики свободных электронов. В применении к белковым кристаллам влияние электронного повреждения на форму атомных формфакторов рассеяния и соответствующие искажения дифракционных картин исследо-

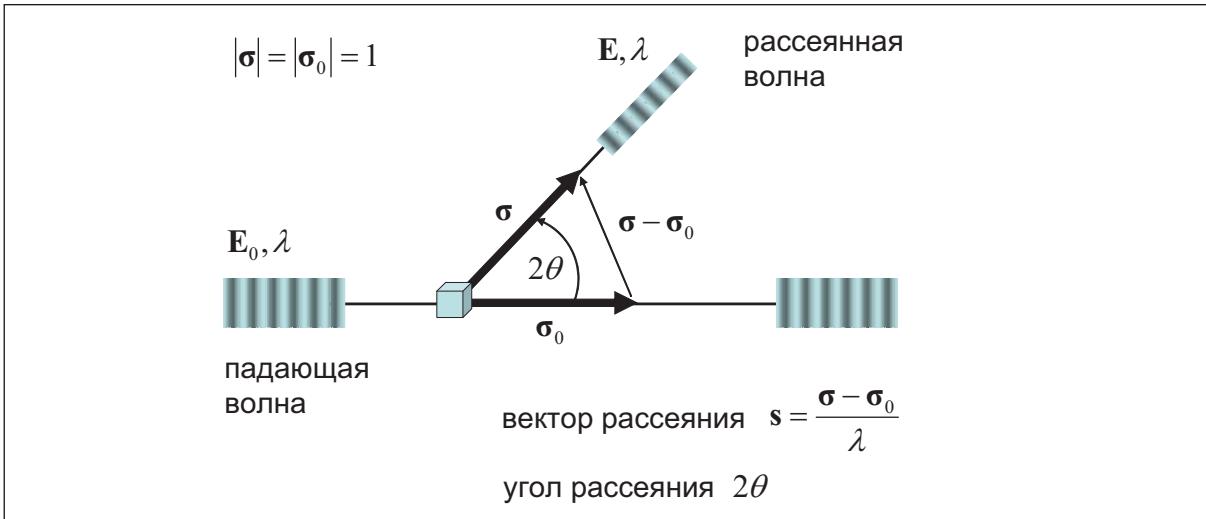


Рис. 1. Схема эксперимента по измерению интерференции рентгеновского излучения на кристалле (молекуле).

довались в работе [74], где предложен эффективный метод учета этих эффектов при расшифровке рентгенограмм, полученных с помощью сверхмощных импульсов в условиях существенной ионизации.

В настоящей работе мы рассматриваем общее уменьшение рассеивающей способности образцов под влиянием электронного повреждения и анализируем вытекающие отсюда ограничения на возможность детектирования данных высокого разрешения в зависимости от размера нанокристаллов. Эти ограничения характеризуют предельные возможности существующих и перспективных рентгеновских лазеров на свободных электронах в области нанокристаллографии.

### **Возможность получить высокое разрешение зависит от интенсивности рассеяния и чувствительности детектора**

Максимальное разрешение, которое может быть получено в данном эксперименте с использованием рентгеновской дифракции, определяется следующими основными факторами: 1) средним числом фотонов, пришедших на детектор в области дифракционных максимумов в зависимости от разрешения и 2) возможностью детектирования этих фотонов, в частности, чувствительностью, уровнем шума, динамическим диапазоном детектора и максимальным детектируемым углом рассеяния, определяемым размером и расположением детектора.

В основе моделирования первого фактора лежит описываемая ниже методика, основанная на кинематической теории рассеяния, [75].

### **Электрон рассеивает ничтожно малую долю падающего на него излучения**

Стандартная схема рентгеновского эксперимента изображена на рис. 1. Объект помещается в поле первичной электромагнитной волны с длиной волны  $\lambda$  и электрическим полем  $E_0$ , распространяющейся в направлении, задаваемом единичным вектором  $\sigma_0$ . Регистрируется вторичная (рассеянная) волна с электрическим полем  $E$ , имеющая ту же длину волны и распространяющаяся от объекта в направлении, задаваемом единичным вектором  $\sigma$ . Измерение интенсивности рассеянной волны проводится для разных сочетаний векторов  $\sigma_0, \sigma$ . (В реальном эксперименте направление падающего пучка остается неизменным, но меняется ориентация исследуемого объекта). Угол между векторами  $\sigma_0, \sigma$  традиционно обозначается  $2\theta$  и называется углом рассеяния. В тех

случаях, когда значение угла  $\theta$  мало, говорят о рассеянии "под малыми углами". Наоборот, "рассеяние под большими углами" подразумевает существенное отличие угла  $\theta$  от нуля.

Основой кинематической теории рассеяния является модель рассеяния электромагнитной волны свободными электронами. В рамках этой модели каждый электрон под воздействием переменного электрического поля (плоской монохроматической электромагнитной волны) становится независимым осциллятором и превращается в источник вторичной (сферической) волны, имеющей ту же самую длину волны [76,77]. Вторичные волны интерферируют и тем определяют картину рассеяния. Влияние вторичных волн на движение электронов считается при этом пренебрежимо малым и не учитывается. Отметим, что излучение РЛСЭ изначально линейно поляризовано. В случае линейно поляризованной волны решение задачи рассеяния позволяет представить амплитуду электрического поля вторичной волны, излучаемой одним электроном, в виде (в системе единиц СГСЭ):

$$E_e = \frac{E_0}{r} \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right) \sin \varphi .$$

Здесь  $\varphi$  – угол между вектором  $E_0$  и направлением рассеяния,  $r$  – расстояние от объекта до точки наблюдения (детектора), существенно превышающее длину волны,  $m_e$  – масса электрона,  $e$  – заряд электрона,  $c$  – скорость света. Средний поток рассеянной энергии определяется квадратом амплитуды рассеянной волны:

$$I_e = c E_e^2 / 8\pi ,$$

для падающей волны имеем аналогично  $I_0 = c E_0^2 / 8\pi$ .

В дальнейшем, при рассмотрении дифракции на кристаллах биологических макромолекул, нас будут интересовать средние значения рассеянной интенсивности в зависимости от угла  $2\theta$  при всевозможных ориентациях кристаллов для различных образцов с заданными параметрами с целью оценки общего разрешения набора дифракционных данных. При таком расчете усредняются различные ориентации вектора электрического поля падающей волны относительно образца. Поэтому в дальнейшем мы проводим расчеты для неполяризованной падающей волны. В этом случае формула для потока энергии волны, рассеянной одним электроном, приобретает вид

$$I_e = \frac{P_T(\theta)}{r^2} \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 I_0 ,$$

где  $P_T(\theta)$  – "фактор поляризации"

$$P_T(\theta) = \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} .$$

Следует заметить, что входящая в эту формулу величина – квадрат так называемого классического радиуса электрона – равна

$$\left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 \approx 7.9 \cdot 10^{-26} \text{ см}^2 ,$$

а обычное для биологической кристаллографии расстояние  $r$  от объекта до детектора составляет 10-20 см, т.е. рассеивается лишь ничтожно малая часть энергии первичной волны. Это объясняет сложность регистрации рассеяния одиночной молекулой и необходимость комплекса мер, таких как повышение интенсивности первичной волны, при-

готовление образца в виде кристалла, повышение чувствительности детектора, для обеспечения регистрации рассеянного излучения. В традиционной рентгеновской кристаллографии малость рассеяния электроном компенсируется когерентным усилением рассеяния в брэгговских пиках от множества кристаллических ячеек. Появление РЛСЭ за счет колоссального увеличения мощности по сравнению с современными синхротронами и возможности осуществления "дифракции до разрушения" позволяет ослабить требования по размеру кристаллов, а в перспективе, возможно, и полностью снять необходимость кристаллизации.

### **Кинематическая теория дифракции связывает интенсивность рассеяния с преобразованием Фурье электронной плотности образца**

При наличии нескольких рассеивающих электронов вторичные волны, исходящие от разных электронов, имеют фазовый сдвиг, зависящий от взаимного расположения электронов. Однако они имеют одинаковую длину волны, поэтому их сложение приводит к суммарной волне с той же длиной волны.

Двумя основными объектами изучения в рентгеновской кристаллографии являются распределение электронной плотности  $\rho(\mathbf{r})$  в исследуемом объекте и (комплексные) структурные факторы  $F(\mathbf{s})$ , соответствующие этому распределению электронов. Функция  $\rho(\mathbf{r})$  описывает распределение рассеивающих электронов в пространстве и нормирована таким образом, что количество электронов в произвольной области  $\Omega$  в трехмерном пространстве вычисляется как интеграл по области  $\Omega$  от функции  $\rho(\mathbf{r})$ . Это эквивалентно тому, что количество электронов в элементарном объеме  $dV_r$ , окружающем точку трехмерного пространства  $\mathbf{r}$ , равно  $\rho(\mathbf{r})dV_r$ .

Структурный фактор может быть введен как отношение комплексной амплитуды рассеянной волны  $E$  к амплитуде волны  $E_e$ , рассеиваемой единичным электроном:

$$F_{\sigma, \sigma_0} = \frac{E}{E_e}.$$

В рамках кинематической теории рассеяния величина структурного фактора зависит только от разности направлений падающей и рассеянной волн и длины волны  $\lambda$ . Именно, величина структурного фактора как функция вектора рассеяния

$$\mathbf{s} = (\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0)/\lambda,$$

связана с распределением электронной плотности в образце трехмерным интегральным преобразованием Фурье:

$$F_{\sigma, \sigma_0} = F(\mathbf{s}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_r,$$

$$\rho(\mathbf{r}) = \int F(\mathbf{s}) \exp[-2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_s.$$

Последняя формула может рассматриваться как разложение электронной плотности по гармоникам Фурье  $\exp[-2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}]$ . Каждая гармоника, рассматриваемая как функция  $\mathbf{r}$ , сохраняет постоянное значение в плоскостях, перпендикулярных направлению  $\mathbf{s}$ , и изменяется по синусоидальному закону вдоль направления  $\mathbf{s}$ . Длина волны этой синусоиды называется в макромолекулярной кристаллографии "разрешением", отвечающим гармонике Фурье  $\exp[-2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}]$ , и вычисляется как

$$d = \frac{1}{|\mathbf{s}|} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}.$$

Для вектора рассеяния  $\mathbf{s}$  введем относительную интенсивность соответствующей рассеянной волны равенством

$$I(\mathbf{s}) = |F(\mathbf{s})|^2.$$

Тогда при неполяризованной падающей волне поток энергии рассеянной волны

$$I_{\sigma,\sigma_0} = I(\mathbf{s})I_e = I(\mathbf{s}) \frac{P_T(\theta)}{r^2} \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 I_0.$$

Для упрощения формул мы будем дальше говорить только об относительной интенсивности  $I(\mathbf{s})$ , подразумевая, что поток энергии определяется по ней последней формулой.

Электромагнитная волна, описываемая амплитудой  $E_0$  и длиной волны  $\lambda$ , может рассматриваться как поток фотонов с плотностью потока  $\Phi$  (фотонов/ $\text{\AA}^2$  сек) и энергией фотона  $E_{\text{photon}}$ . Параметры волны связаны с параметрами потока фотонов соотношениями

$$E_{\text{photon}} = \frac{hc}{\lambda} \quad , \quad \Phi = \frac{\lambda}{8\pi h} E_0^2 = \frac{\lambda}{hc} I_0$$

( $h$  – постоянная Планка,  $c$  – скорость света). Поэтому плотность потока фотонов может быть записана в виде:

$$\Phi_{\sigma,\sigma_0} = \Phi(\mathbf{s}) = I(\mathbf{s}) \frac{P_T(\theta)}{r^2} \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 \Phi_0.$$

Здесь  $\Phi_0$  – плотность потока фотонов в первичном пучке, распространяющемся в направлении  $\sigma_0$ ,  $\Phi_{\sigma,\sigma_0}$  – плотность потока фотонов, рассеянных в направлении  $\sigma$ .

Рассмотрим случай, когда функция  $I(\mathbf{s})$  мало меняется в точках пикселя детектора (такой случай имеет место, если мы изучаем рассеяние отдельной частицей), и оценим число фотонов  $\Phi_{\text{pixel}}(\mathbf{s})$ , попадающих (в единицу времени) на пиксель, определяемый вектором рассеяния  $\mathbf{s}$ . Оно пропорционально площади пикселя и зависит от угла, под которым направление  $\sigma$  пересекает пиксель. Если детектор установлен так, что его плоскость перпендикулярна направлению первичного пучка, то этот угол равен углу рассеяния  $2\theta$ , и количество фотонов, приходящих на пиксель площади  $S$ , пропорционально величине  $S \cos 2\theta$ . Если обозначить  $l$  – расстояние кристалл – детектор, то расстояние от объекта до точки пикселя есть  $r = \frac{l}{\cos 2\theta}$ . Отсюда получаем:

$$\Phi_{\text{pixel}}(\mathbf{s}) = \Phi_0 \cdot P_T(\theta) \cdot \frac{\cos^3 2\theta}{l^2} \cdot S \cdot \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 I(\mathbf{s}).$$

Заметим, что величина  $\frac{\cos^3 2\theta}{l^2} \cdot S$  – это телесный угол, под которым виден пиксель из положения образца. Поэтому количество рассеиваемых фотонов в единицу времени на единицу телесного угла выражается формулой:

$$\Phi_{\text{solidangle}}(\mathbf{s}) = \Phi_0 \cdot P_T(\theta) \cdot \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 I(\mathbf{s})$$

### **Интенсивность дифракции зависит от положений атомов и их электронной конфигурации**

За редкими исключениями в работах по биологической кристаллографии предполагается, что распределение электронной плотности в изучаемом объекте, состоящем из  $N$  атомов, может быть с достаточной точностью описано суммой электронных плотностей отдельных атомов:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{j=1}^N \rho_{0,j}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_j|).$$

Здесь  $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N$  – координаты центров атомов, функция  $\rho_{0,j}(r)$  описывает распределение электронной плотности в  $j$ -ом атоме, помещенном в начало координат. Учет тонких эффектов перераспределения электронной плотности в процессе образования валентных связей (моделирование "деформационной плотности") становится возможным лишь при наличии экспериментальных данных очень высокого разрешения (лучше 0.8 Å).

В приближении отдельных атомов формула для структурного фактора образца принимает вид:

$$F(\mathbf{s}) = \sum_{j=1}^N f_j(s) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j],$$

где введена величина

$$f_j(s) = \frac{2}{s} \int_0^{+\infty} r \rho_0(r) \sin(2\pi s r) dr$$

– атомный формфактор рассеяния, соответствующий электронной плотности данного атома, которая рассматривается в сферически-симметричном приближении  $\rho(\mathbf{r}) = \rho_0(r)$ . Таким образом, расчет интенсивности рассеяния сводится к нахождению координат всех атомов в образце и их формфакторов рассеяния.

Приведенные выше формулы предполагают, что координаты атомов однозначно определены и не меняются в процессе эксперимента. Однако в реальной ситуации может существовать как динамическая, так и статическая неопределенность в координатах атомов. Динамическая неопределенность связана с возможным движением атомов в процессе эксперимента (например, с тепловыми колебаниями). Статическая неопределенность связана с тем, что положение конкретного атома может быть различным в разных копиях элементарной ячейки в кристалле, либо в разных экземплярах объекта, использованных для эксперимента. Неопределенность в положении  $j$ -го атома может быть описана посредством задания плотности распределения вероятностей смещений центра атома  $P_j(\mathbf{r})$ . Распределение электронной плотности в атоме в этом случае не определено однозначно, и мы можем говорить лишь об ожидаемой (средней) электронной плотности

$$\rho_j^{ave}(\mathbf{r}) = \langle \rho_j(\mathbf{r}) \rangle = \int \rho_j(\mathbf{r} - \mathbf{u}) P_j(\mathbf{u}) dV_u = (\rho_j * P_j)(\mathbf{r}).$$

Здесь \* обозначает операцию свертки. Используя приближение отдельных атомов и указанные средние значения электронной плотности, а также учитывая, что преобразование Фурье переводит свертку в произведение, мы получаем формулу для расчета структурных факторов в виде

$$F(\mathbf{s}) = \sum_{j=1}^N f_j(s) T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j].$$

Входящие в эту формулу множители – факторы Дебая-Валлера  $T_j(\mathbf{s})$  – являются преобразованием Фурье функций  $P_j(\mathbf{r})$ , описывающих неопределенность в положении атомов,

$$T_j(\mathbf{s}) = \int P_j(\mathbf{r}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}] dV_r.$$

В простейшем случае, когда неопределенность моделируется сферически симметричной гауссовой функцией

$$P_j(\mathbf{r}) = \left( \frac{4\pi}{B_j} \right)^{3/2} \exp \left[ -\frac{4\pi^2 r^2}{B_j} \right],$$

факторы Дебая-Валлера тоже сферически симметричны и имеют вид

$$T_j(s) = \exp \left[ -B_j \frac{s^2}{4} \right].$$

Здесь  $B_j$  – параметр Дебая-Валлера, характеризующий неопределенность в положении атома.

### **В случае рентгеновских лазеров структура атомов существенно меняется в ходе эксперимента**

Как было указано выше, под действием мощного рентгеновского излучения большая часть атомов в образце подвергается ионизации. Поэтому распределение электронной плотности в них, а значит, и атомные формфакторы рассеяния, изменяются с течением времени в процессе эксперимента. Соответственно, для адекватного описания дифракции в этих условиях должна быть промоделирована эволюция электронных конфигураций атомов (рассеивающих центров) под действием рентгеновских импульсов. Для каждого атома рассматриваются все его конфигурации: нейтральное состояние и всевозможные ионизованные (в том числе многократно) состояния, вплоть до голого ядра. Процессы фотоионизации, Оже-распада и флуоресценции соответствуют переходам атомов между определенными конфигурациями, причем переходы являются случайными событиями. Для описания распределения атомов по конфигурациям вводятся величины  $P_I$  – заселенности конфигураций, где индекс  $I$  нумерует все конфигурации данного атома (сумма заселенностей тождественно равна единице). Переходы атомов между конфигурациями описываются с помощью скоростных уравнений вида:

$$\frac{d}{dt} P_I(t) = \sum_{I' \neq I} [\Gamma_{I' \rightarrow I} P_{I'}(t) - \Gamma_{I \rightarrow I'} P_I(t)],$$

где  $\Gamma_{I \rightarrow I'}$  – скорость перехода из конфигурации  $I$  в конфигурацию  $I'$ . При этом скорость переходов, соответствующих фотоионизации, пропорциональна интенсивности падающего излучения и, вообще говоря, меняется в течение импульса, а скорости Оже-распада и флуоресценции постоянны.

Импульс РЛСЭ характеризуется интегральным потоком фотонов (*Fluence* – общее число фотонов на квадратный ангстрем за время импульса) и временным профилем плотности потока  $j(t)$  (число фотонов на квадратный ангстрем в секунду), которые связаны условием нормировки

$$Fluence = \int j(t) dt.$$

Профиль плотности потока в наших расчетах предполагался гауссовым

$$j(t) = j_0 \exp \left[ -t^2 / t_p^2 \right],$$

где параметр  $t_p$  определяет длительность импульса и связан с его полной шириной на половине высоты (*FWHM*) соотношением  $t_p = FWHM / 2\sqrt{\ln 2}$ . Амплитуда  $j_0$  плотности потока определяется условием нормировки. Расчеты проводились при значении энергии фотонов 8 кэВ, что соответствует длине волны 1.55 Å.

В результате решения скоростных уравнений определяются зависимости заселенностей электронных конфигураций от времени. Заселенности играют роль вероятностей нахождения атома в той или иной конфигурации, поэтому его электронная плотность становится случайной величиной  $\tilde{\rho}(\mathbf{r}; t)$ . Зная заселенности  $P_I(t)$  и распределение электронной плотности в каждой конфигурации  $\rho_I(\mathbf{r})$ , можно вычислить математическое ожидание электронной плотности атома

$$\rho(\mathbf{r}; t) = M(\tilde{\rho}(\mathbf{r}; t)) = \sum_I P_I(t) \rho_I(\mathbf{r})$$

и соответствующий ожидаемый формфактор  $f(s; t)$  в каждый момент времени.

Математическое ожидание структурного фактора всего образца тоже становится нестационарным:

$$F(\mathbf{s}; t) = \sum_{j=1}^N f_j(s; t) T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j].$$

В течение импульса одновременно изменяется и интенсивность падающего излучения  $j(t)$ , и структурный фактор образца  $F(\mathbf{s}; t)$ , от которых зависит интенсивность рассеяния. Поэтому средняя относительная интенсивность рассеянного излучения, накопленного за всё время импульса, получается интегрированием мгновенной относительной интенсивности с весом, определяемым формой импульса:

$$I_{tot}(\mathbf{s}) = \frac{1}{Fluence} \int j(t) F(\mathbf{s}; t)^2 dt.$$

### **Для оценок интенсивности рассеяния можно использовать атомный формфактор, усредненный по времени импульса**

Известно, что формфакторы атомов С, N, O – основных атомов биологических молекул, дающих наибольший вклад в дифракцию, – имеют похожую форму [74]. Поэтому при расчете дифракционных картин для кристаллов биомолекул атомные формфакторы могут быть с разумной точностью приближены так называемыми унитарными формфакторами – функциями вида:

$$f_j(s) = Z_j f_{unit}(s),$$

где  $Z_j$  – число рассеивающих электронов в  $j$ -ом атоме, а  $f_{unit}(s)$  – некоторая универсальная функция, задающая общую форму кривой, в пересчете на один рассеивающий электрон.

Следуя идеи унитарных формфакторов, можно предположить, что, с некоторой точностью, и в нестационарном случае формфакторы всех атомов биомолекулы пропорциональны некоторому унитарному нестационарному формфактору  $f_{ns\_unit}(s; t)$  с коэффициентом пропорциональности, равным числу электронов в неповрежденном атоме:

$$f_j(s; t) = Z_j f_{unit}(s; t).$$

В этом приближении формула накопленной интенсивности приобретает вид

$$\begin{aligned} I_{tot}(\mathbf{s}) &= \sum_{j,k=1}^N Z_j Z_k f_{unit}^{eff}(s)^2 T_j(\mathbf{s}) T_k(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)] \\ &= \left| \sum_j Z_j f_{unit}^{eff}(s) T_j(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j] \right|^2, \end{aligned}$$

где "эффективный унитарный формфактор"  $f_{unit}^{eff}(s)$  определен формулой

$$f_{unit}^{eff}(s) = \sqrt{\frac{1}{Fluence} \int j(t) f_{unit}(s; t)^2 dt}.$$

В настоящей работе мы используем в качестве унитарного нестационарного формфактора  $f_{unit}(s; t)$  нестационарный формфактор атома углерода, деленный на 6 (число электронов).

Предположим также, что все атомы приближенно описываются одним и тем же фактором Дебая-Валлера  $T(\mathbf{s}) = \exp\left[-\frac{B}{4}s^2\right]$ .

В случае, когда структура объекта известна (и, следовательно, величины  $I(\mathbf{s})$  известны), формула для  $\Phi_{pixel}(\mathbf{s})$  позволяет оценивать число фотонов для каждого пикселя детектора индивидуально. Если структура неизвестна, можно поставить задачу оценки "среднего" (по всевозможным структурам фиксированного размера) числа фотонов, приходящих на данный пиксель. Используя изложенное выше приближение унитарных формфакторов, получаем:

$$\begin{aligned} I_{tot}(\mathbf{s}) &= \sum_{j,k=1}^N Z_j Z_k f_{unit}^{eff}(s)^2 T^2(\mathbf{s}) \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)] \\ &= T^2(\mathbf{s}) f_{unit}^{eff}(s)^2 \left( \sum_j Z_j^2 + \sum_{j \neq k} Z_j Z_k \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)] \right). \end{aligned}$$

Усреднение по всевозможным координатам атомов в пределах данной элементарной ячейки обращает вторую сумму в скобках в пренебрежимо малую величину, поэтому

$$\langle I_{tot}(\mathbf{s}) \rangle = N \bar{Z}^2 T^2(\mathbf{s}) f_{unit}^{eff}(s)^2,$$

где  $\bar{Z} = \sqrt{\sum_j Z_j^2}$  – среднеквадратичный заряд атомов образца.

С учетом этого формула для оценки числа фотонов, попавших на пиксель детектора, приобретает вид

$$\Phi_{pixel}^{tot}(\mathbf{s}) = Fluence \cdot P_T(\theta) \cdot \frac{\cos^3 2\theta}{l^2} \cdot S \cdot \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 \cdot \exp\left[-\frac{B}{2}s^2\right] \cdot N \cdot \bar{Z}^2 \cdot f_{unit}^{eff}(s)^2.$$

Соответствующая формула для числа фотонов на единицу телесного угла имеет вид:

$$\Phi_{solid\ angle}^{tot}(\mathbf{s}) = Fluence \cdot P_T(\theta) \cdot \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 \cdot \exp\left[-\frac{B}{2}s^2\right] \cdot N \cdot \bar{Z}^2 \cdot f_{unit}^{eff}(s)^2.$$

### **Рассеяние на кристалле характеризуется интенсивностями дискретного набора дифракционных максимумов**

При работе с кристаллическим объектом относительная интенсивность рассеяния  $I(\mathbf{s})$  резко меняет вид – она распадается в сумму узких пиков. Это приводит к двум следствиям. Во-первых, возникают выделенные направления рассеяния (брэгговские рефлексы), для которых интенсивность рассеяния резко возрастает. Во-вторых, ширина дифракционных максимумов становится меньше размера пикселя, и число фотонов, попавших на пиксель, больше не является прямо пропорциональным площади пикселя детектора.

Оценим число фотонов  $N_{spot}$ , попавших в данный дифракционный максимум.

Рассмотрим случай, когда исследуемый объект состоит из  $M$  идентичных "блоков", сдвинутых относительно друг друга без поворотов. В этом случае

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\alpha=1}^M \rho_{UC}(\mathbf{r} - \mathbf{t}_{\alpha}).$$

где  $\rho_{UC}(\mathbf{r})$  – распределение плотности в единичном блоке, из которых построен объект,  $\mathbf{t}_1, \mathbf{t}_2, \dots, \mathbf{t}_M$  – векторы сдвигов блоков. Структурные факторы в этом случае могут быть представлены в виде произведения

$$F(\mathbf{s}) = F_{UC}(\mathbf{s})G(\mathbf{s}; A),$$

где  $F_{UC}(\mathbf{s})$  – структурные факторы, соответствующие базовому блоку  $\rho_{UC}(\mathbf{r})$ , а так называемая "интерференционная функция"  $G(\mathbf{s}; A)$  имеет вид

$$G(\mathbf{s}; A) = \sum_{\alpha=1}^M \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{t}_{\alpha}].$$

Здесь  $A$  обозначает множество векторов сдвига:  $A = \{\mathbf{t}_1, \mathbf{t}_2, \dots, \mathbf{t}_M\}$ . Соответственно относительная интенсивность вычисляется как

$$I(\mathbf{s}) = I_{UC}(\mathbf{s})|G(\mathbf{s}; A)|^2,$$

где  $I_{UC}(\mathbf{s})$  вычисляется по содержимому одной элементарной ячейки. Это разложение становится особенно важным, если исследуется кристаллический образец, т.е.

- распределение электронной плотности в объекте полностью определяется содержащим элементарной ячейки – параллелепипеда  $V$ , построенного на векторах  $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$ ;
- объект построен из идентичных элементарных ячеек, сдвинутых на целочисленные комбинации векторов  $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$ .

Выбрав векторы  $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$  в качестве базиса пространства, мы можем задать каждый вектор  $\mathbf{r}$  его координатами в этом базисе

$$\mathbf{r} = x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c}.$$

В кристаллографии координаты  $(x, y, z)$  называются относительными координатами точки прямого пространства, а базис  $\{\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}\}$  – базисом прямого пространства. Сопряженный базис (или базис "обратного пространства")  $\{\mathbf{a}^*, \mathbf{b}^*, \mathbf{c}^*\}$  определяется условиями

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \cdot \mathbf{a}^* &= \mathbf{b} \cdot \mathbf{b}^* = \mathbf{c} \cdot \mathbf{c}^* = 1, \\ \mathbf{a} \cdot \mathbf{b}^* &= \mathbf{a} \cdot \mathbf{c}^* = \mathbf{b} \cdot \mathbf{a}^* = \mathbf{b} \cdot \mathbf{c}^* = \mathbf{c} \cdot \mathbf{a}^* = \mathbf{c} \cdot \mathbf{b}^* = 0. \end{aligned}$$

Вектор рассеяния  $\mathbf{s}$  принято задавать координатами в базисе обратного пространства

$$\mathbf{s} = h\mathbf{a}^* + k\mathbf{b}^* + l\mathbf{c}^*,$$

и называть  $(h, k, l)$  индексами рефлекса. При таком выборе координат скалярное произведение векторов  $\mathbf{r}$  и  $\mathbf{s}$  записывается в виде

$$\mathbf{s} \cdot \mathbf{r} = hx + ky + lz.$$

Пусть множество векторов сдвига  $A$  состоит из векторов  $\mathbf{t}_{\alpha}$ , имеющих целочисленные относительные координаты  $(u_{\alpha}, v_{\alpha}, w_{\alpha})$ , т.е. все сдвиги кратны базисным векторам элементарной ячейки. В таком случае для любого вектора рассеяния  $\mathbf{s}$  с целочисленными индексами  $(h, k, l)$  имеем

$$G(\mathbf{s}; A) = \sum_{\alpha=1}^M \exp[2\pi i (hu_{\alpha} + kv_{\alpha} + lw_{\alpha})] = M,$$

поскольку все показатели экспонент кратны  $2\pi i$ . Из последней формулы следуют два важных вывода. Во-первых, регистрируемые в эксперименте структурные факторы для векторов рассеяния с целочисленными индексами пропорциональны структурным факторам, рассчитанным по содержимому одной элементарной ячейки, с одним и тем же коэффициентом пропорциональности, не зависящим от индексов рефлекса. Ввиду

указанной пропорциональности термин "структурные факторы" применяется в кристаллографии и к величинам  $F_{UC}(\mathbf{s})$ , рассчитанным по содержимому одной элементарной ячейки. Следует также подчеркнуть, что эта пропорциональность имеет место только для векторов рассеяния с целочисленными индексами и не имеет места для произвольных векторов рассеяния. Во-вторых, при целочисленных индексах структурный фактор кристаллического образца превосходит структурный фактор одной ячейки в  $M$  раз, а соответствующая интенсивность рассеяния в  $M^2$  раз, где  $M$  – число элементарных ячеек, повторенных в кристалле.

Предположим, что кристалл имеет форму параллелепипеда и по всем трем осям кристалла уложено по  $m$  элементарных ячеек, так что общее число ячеек в кристалле равно  $M = m^3$ . В этом случае интерференционная функция вычисляется в явном виде:

$$G(\mathbf{s}; A) = \sum_{\alpha=1}^M \exp[2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{t}_\alpha]$$

$$|G(\mathbf{s}; M)|^2 = \frac{\sin^2 2\pi nh}{\sin^2 2\pi h} \cdot \frac{\sin^2 2\pi nk}{\sin^2 2\pi k} \cdot \frac{\sin^2 2\pi nl}{\sin^2 2\pi l}.$$

Эта функция имеет максимумы высотой  $m^6 = M^2$  в точках с целочисленными индексами  $h, k, l$ , при этом ширина пика по каждому из трех направлений оценивается величиной  $1/m$ . Предположим еще, что длины ребра элементарной ячейки ортогональны и имеют одинаковую длину  $a = \sqrt[3]{V_{UC}}$ , где  $V_{UC}$  – объем элементарной ячейки. В этом случае вариации вектора  $\mathbf{s}$  в пределах пятна оцениваются величиной  $\delta\mathbf{s} = \lambda\delta\theta = \lambda/ma$ , т.е. телесный угол, соответствующий области пика, равен  $(\lambda/ma)^2$ . Интегрирование интерференционной функции по этому телесному углу приводит к величине порядка  $\lambda^2 m^4/a^2$ . При этом число фотонов, рассеиваемое на единицу телесного угла, выражается формулой:

$$\Phi_{solid\ angle}(\mathbf{s}) = \Phi_0 \cdot P_T(\theta) \cdot \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 I(\mathbf{s})$$

Поэтому формула для подсчета числа фотонов, рассеянных в телесный угол, отвечающий области дифракционного максимума, приобретает вид

$$N_{spot}(s) = Fluence \cdot P_T(\theta) \cdot \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 \cdot \frac{\lambda^2}{a^2} \cdot m^4 \cdot N \cdot \bar{Z}^2 \cdot [f_{unit}^{eff}(s)]^2 \cdot \exp\left[-\frac{B}{2}s^2\right]$$

или

$$N_{spot}(\theta) = Fluence \cdot P_T(\theta) \cdot \left( \frac{e^2}{m_e c^2} \right)^2 \cdot \left[ \frac{\lambda^3}{V_{UC}} \right]^{2/3} \cdot M^{4/3} \cdot N \cdot \bar{Z}^2 \cdot [f_{unit}^{eff}(s)]^2 \cdot \exp\left[-B \frac{s^2}{2}\right].$$

Эта формула лежит в основе оценок максимального достижимого разрешения, рассматриваемых далее и позволяющих охарактеризовать возможности РЛСЭ в области кристаллографии.

### **Предельное достижимое разрешение зависит от параметров кристалла, рентгеновского импульса и детектора**

Рассеянное кристаллом излучение даст информацию о структуре исследуемой молекулы только в том случае, если его удастся успешно детектировать с приемлемой точностью. Основными существенными для этого параметрами детекторов являются их чувствительность, уровень шума и динамический диапазон. Чувствительность характеризует минимальное количество фотонов на пиксель детектора, генерирующее регистрируемый сигнал. Уровень шума определяет среднюю ошибку в измеренном значе-

ния интенсивности ввиду различных помех. Динамический диапазон – это отношение наибольшей к наименьшей корректно детектируемой интенсивности. Поскольку в среднем интенсивность рефлексов убывает с увеличением разрешения, то чувствительность и уровень шума задают пороговое (минимальное достаточно точно детектируемое) значение интенсивности, соответствующее максимальному разрешению, доступному в данной экспериментальной конфигурации. Динамический диапазон накладывает ограничение на отношение интенсивностей малоугловых (наиболее интенсивных) пиков и пиков самого высокого детектируемого разрешения. Если диапазон интенсивностей, выделяемый порогом чувствительности и шума, выходит за пределы динамического диапазона, то необходимо пожертвовать рефлексами либо самого высокого, либо самого низкого разрешения (так как используемые в настоящий момент детекторы типа CCD (charge-coupled device) могут быть настроены для детектирования больших или меньших интенсивностей – “gain setting”). Однако отсутствие данных низкого разрешения обычно приводит к проблемам в расшифровке дифракционных данных, поэтому в типичном случае их необходимо сохранить, и соответственно, динамический диапазон накладывает еще одно, независимое ограничение на максимальное детектируемое разрешение.

В количественной форме ограничения детектора можно выразить следующим образом. Пороговое (минимальное детектируемое) число фотонов определяется выражением:

$$N_{min, detectable} = \max (N_{sensitivity}, N_{noise} R_{signal / noise, min}),$$

где  $N_{sensitivity}$  – минимальное количество фотонов на пиксель детектора, генерирующее регистрируемый сигнал;  $N_{noise}$  – средняя ошибка в измеренном значении числа фотонов, обусловленная шумом (измеряемая в фотонах на пиксель детектора);  $R_{signal / noise, min}$  – минимальное отношение сигнал/шум, при котором возможна расшифровка дифракционных картин с приемлемой точностью.

Минимальное число фотонов, попадающее в рамки динамического диапазона, задается формулой:

$$N_{min, dynamic range} = \frac{N_{photons}(0)}{R_{dynamic range}},$$

где  $N_{photons}(0)$  – число фотонов в пиках самого низкого разрешения,  $R_{dynamic range}$  – величина динамического диапазона детектора.

Детектируемое разрешение должно одновременно удовлетворять условиям

$$N_{photons}(\theta) > N_{min, detectable}$$

и

$$N_{photons}(\theta) > N_{min, dynamic range},$$

поэтому максимальное детектируемое разрешение определяется условием:

$$N_{photons}(\theta_{max}) = \max (N_{min, detectable}, N_{min, dynamic range}).$$

При этом предполагается, что геометрия детектора (размер и расположение) позволяют детектировать данные с найденного максимального угла.

Для повышения эффективного динамического диапазона может использоваться схема с каскадом двух (или более) детекторов, расположенных на разных расстояниях от образца. В такой схеме передний детектор записывает высокоугловые пики высокого разрешения, а задний детектор – пики низкого разрешения. В предположении, что чувствительность каждого детектора может быть настроена на нужный диапазон интенсивностей, теоретический предел общего динамического диапазона такого каскада

равен диапазону одного детектора в степени, равной их количеству. Практически, однако, в такой схеме возникают проблемы совмещения данных от разных детекторов в единый набор интенсивностей, которые могут ограничивать возможности такого подхода.

В эксперименте по нанокристаллографии на рентгеновском лазере [65] передние детекторы были настроены таким образом, что пиксель насыщался при попадании 78 фотонов с энергией 1.8 кэВ, имелась чувствительность к единичным фотонам, а шум был менее 1 фотона. Таким образом, параметры детектора оценивались величинами  $R_{dynamic\ range} \sim 10^2$ ,  $N_{sensitivity} \sim 1$ ,  $N_{noise} < 1$ . Технология детекторов для рентгеновских лазеров активно развивается, и параметры новых детекторов (типа AGIPD – The Adaptive Gain Integrating Pixel Detector), разработанных для Европейского XFEL, оцениваются величинами  $R_{dynamic\ range} \sim 10^4$ ,  $N_{sensitivity} \sim 1$ ,  $N_{noise} \sim 10^{-1}$  для фотонов с энергией 12.4 кэВ [78]. Успешное применение каскадной схемы с использованием двух таких детекторов потенциально может повысить динамический диапазон до  $R_{dynamic\ range} \sim 10^8$ .

В моделировании мы рассматриваем два варианта порогового значения числа фотонов:  $N_{min, detectable} = 1,10$  (минимальное детектируемое число фотонов 1 и 10 соответственно), а также три значения динамического диапазона:  $R_{dynamic\ range} = 10^2, 10^4, 10^8$ . Каждый из этих параметров определяет границу сверху для разрешения, доступного в данных условиях эксперимента. Мы изображаем зависимость этих максимальных разрешений от размера кристалла, используя в качестве модельной макромолекулы белок лизоцим.

Как видно из формулы для  $N_{spot}(\theta)$ , параметр Дебая-Валлера, стоящий под экспонентой, может оказывать радикальное влияние на рассеиваемую интенсивность. Фактически, если кристалл плохо упорядочен на данном масштабе расстояний, то рассеяние в данной области разрешений будет крайне слабым (причем, как отмечалось выше, здесь играет роль как статическая, так и динамическая, т.е. температурная неупорядоченность). Именно поэтому большинство экспериментов в традиционном рентгеноструктурном анализе производится при криогенных температурах (около 100 К) для снижения температурной неупорядоченности кристаллов. Рентгеновские лазеры, однако, за счет колossalной интенсивности импульсов, мотивируют широкое применение дифракции при комнатной температуре (что может лучше воспроизвести структуру молекул в природных условиях). Ввиду этого имеет смысл рассматривать в моделировании различные значения параметра Дебая-Валлера, характеризуя рассеяние как на высокоупорядоченных, так и на слабо упорядоченных кристаллах в разных возможных экспериментах. Мы рассматриваем следующие значения параметра  $B$ :

$28.5 \text{ \AA}^2$  – из работы [67], где анализировалась дифракция на лизоциме при комнатной температуре на рентгеновском лазере, а также на синхротроне, с близкими значениями параметров Дебая-Валлера;

$12 \text{ \AA}^2$  – среднее значение в структуре лизоцима с кодом 4LZT из банка PDB, которая была получена при комнатной температуре на синхротроне;

$3.5 \text{ \AA}^2$  – среднее значение для структуры лизоцима 2VB1 банка PDB, полученной при температуре 100 К.

Параметры импульса рентгеновского лазера брались, исходя из имеющихся и перспективных возможностей РЛСЭ. Рассматривались интенсивности, соответствующие плотностям потока фотонов  $10^3$  (текущее значение на лазере LCLS, Стенфорд, США),  $10^6$ ,  $10^8$  (перспективные значения при использовании схем посева и т.п.) фотонов на  $\text{\AA}^2$ . Рассматривались также две длительности импульсов: 0.1 фс (перспективное значение, позволяющее оптимальным образом снизить радиационное повреждение) и 10 фс (реализованное в настоящем времени на LCLS значение).

Результаты моделирования максимальных разрешений при различных значениях параметров образца и эксперимента приведены на рис. 2-4. Они обсуждаются в следующем разделе.

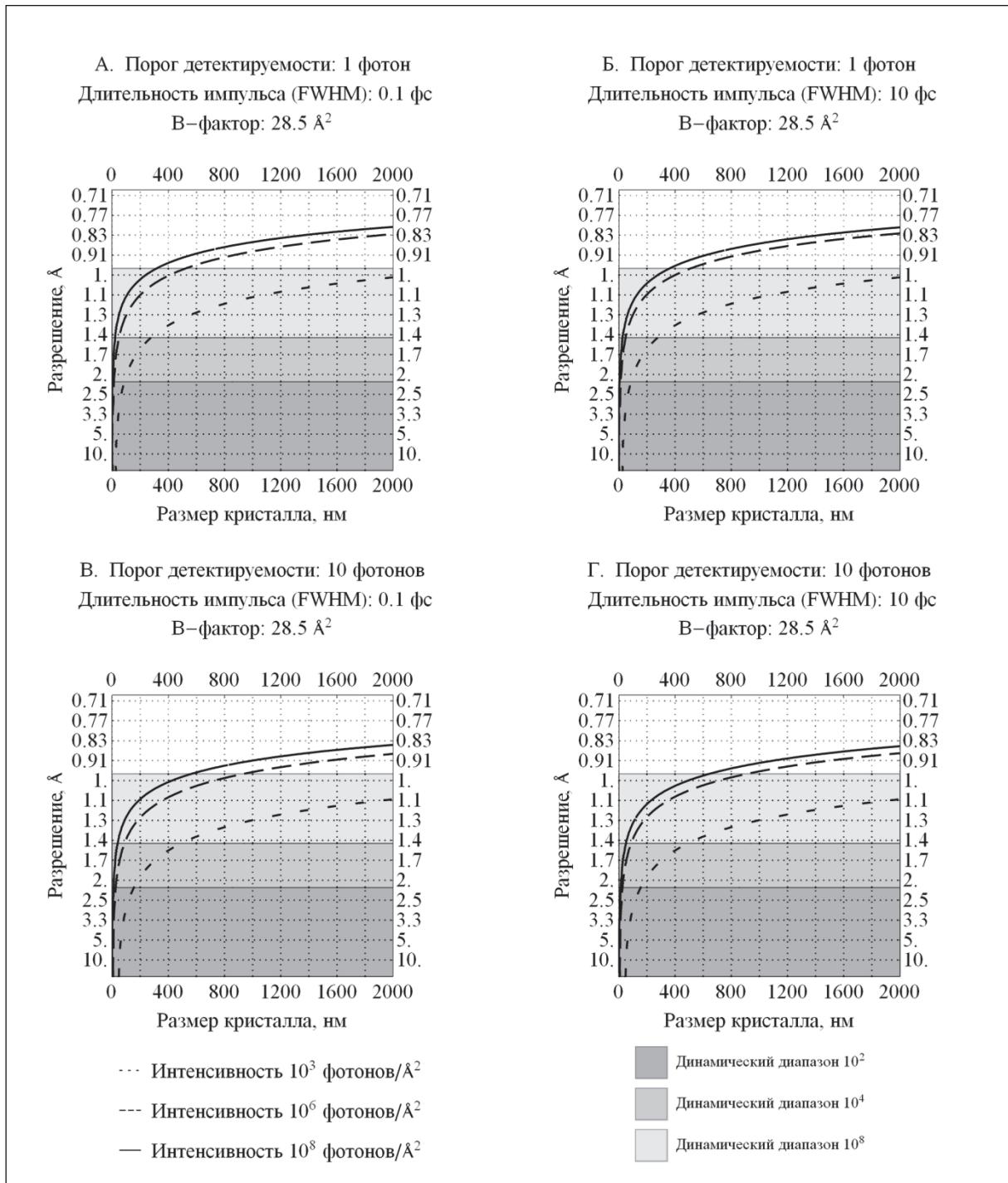
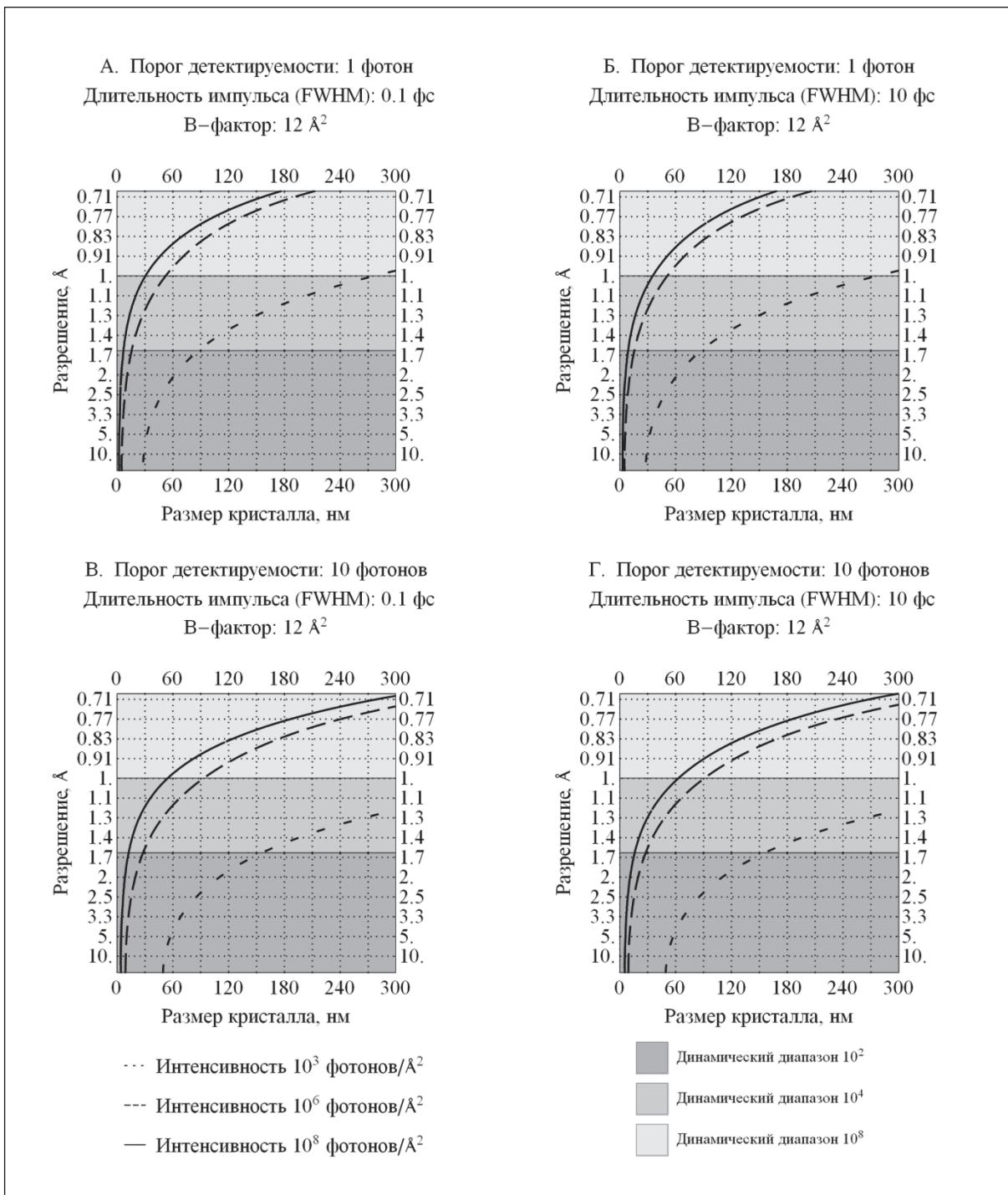


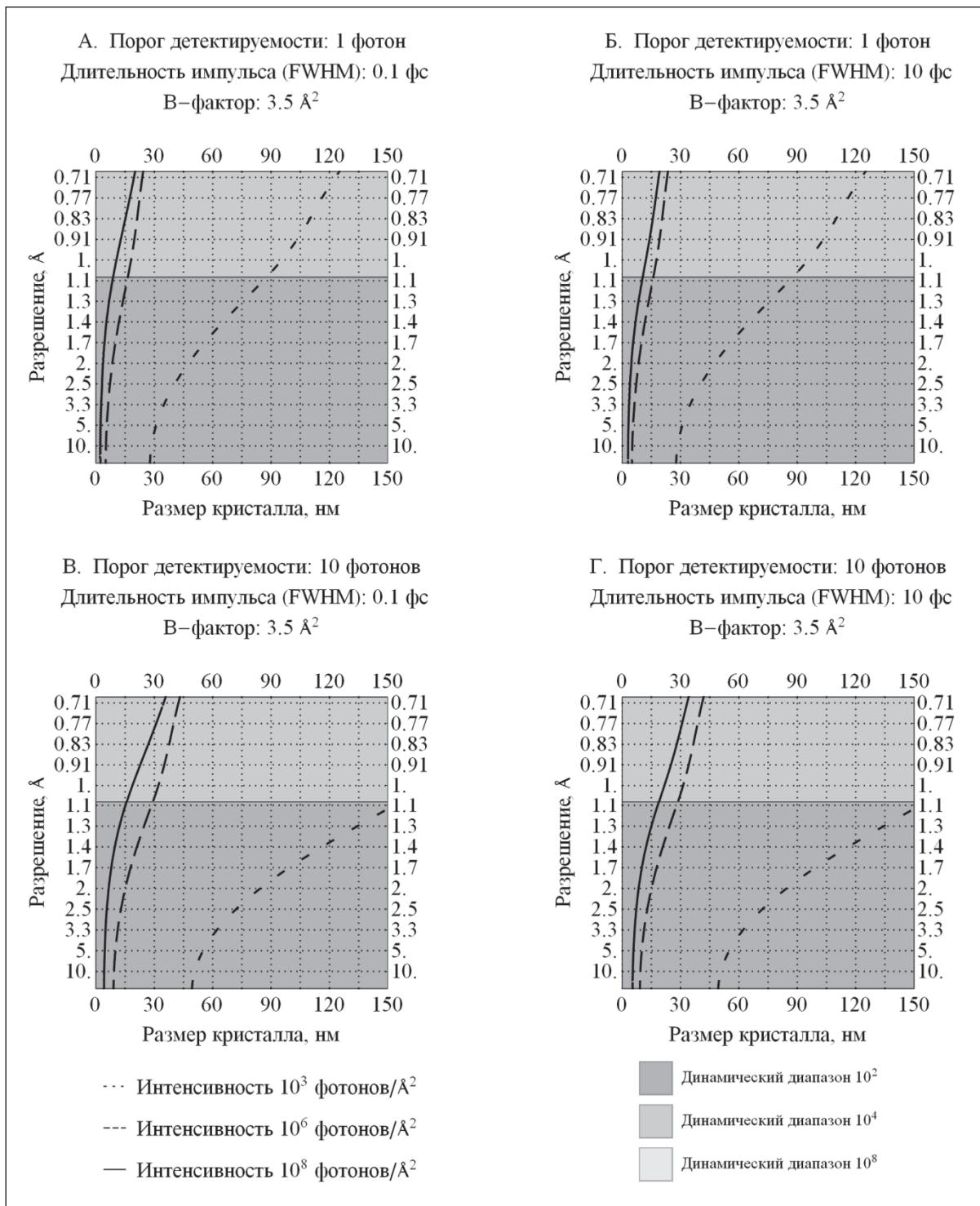
Рис. 2. Оценка максимального детектируемого разрешения в зависимости от размеров (триклинического) кристалла лизоцима и от интенсивности и длительности импульса рентгеновского лазера. Цветом показаны зоны разрешений, доступные для детекторов в зависимости от их динамического диапазона. Параметры:  $B = 28.5 \text{ \AA}^2$ , А.  $N_{min, detectable} = 1$ ,  $FWHM = 0.1 \text{ фс}$ . Б.  $N_{min, detectable} = 1$ ,  $FWHM = 10 \text{ фс}$ . В.  $N_{min, detectable} = 10$ ,  $FWHM = 0.1 \text{ фс}$ . Г.  $N_{min, detectable} = 10$ ,  $FWHM = 10 \text{ фс}$ .

Рис. 3. То же, что рис. 2, но для  $B=12\text{\AA}^2$ .

### Рентгеновский лазер позволяет исследовать кристаллы в 10-1000 раз меньшего размера, чем используемые на синхротронах

Как видно из рис. 2-4, ключевое значение для достижения больших разрешений на малых кристаллах имеют высокая интенсивность импульса, высокие чувствительность и динамический диапазон детекторов, а также малый параметр Дебая-Валлера неупорядоченности кристаллов.

Рассмотрим условия получения разрешения порядка атомного, например, для разрешения  $1.4 \text{ \AA}$ . Оно может быть получено в следующих ситуациях.

Рис. 4. То же, что рис. 2, но для  $B = 3.5 \text{ \AA}^2$ .

При пороге чувствительности детектора в 1 фотон:

- 1) при параметре Дебая-Валлера  $28.5 \text{ \AA}^2$  – на кристаллах с линейным размером порядка 100 элементарных ячеек ( $\sim 300$  нм) при интенсивности  $10^3$  фотонов на  $\text{\AA}^2$  и порядка 20 ячеек ( $\sim 60$  нм) при интенсивности  $10^6$  фотонов на  $\text{\AA}^2$ ; динамический диапазон не ниже  $10^4$ ;

- 2) при параметре Дебая-Валлера  $12 \text{ \AA}^2$  – на кристаллах с линейным размером порядка 40 элементарных ячеек ( $\sim 120 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^3$  фотонов на  $\text{\AA}^2$  и порядка 7 ячеек ( $\sim 20 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^6$  фотонов на  $\text{\AA}^2$ ;
- 3) при параметре Дебая-Валлера  $3.5 \text{ \AA}^2$  – на кристаллах с линейным размером порядка 22 элементарных ячеек ( $\sim 65 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^3$  фотонов на  $\text{\AA}^2$  и порядка 5 ячеек ( $\sim 15 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^6$  фотонов на  $\text{\AA}^2$ ;

При пороге чувствительности детектора в 10 фотонов:

- 1) при параметре Дебая-Валлера  $28.5 \text{ \AA}^2$  – на кристаллах с линейным размером порядка 170 элементарных ячеек ( $\sim 500 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^3$  фотонов на  $\text{\AA}^2$  и порядка 30 ячеек ( $\sim 100 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^6$  фотонов на  $\text{\AA}^2$ ; динамический диапазон не ниже  $10^4$ ;
- 2) при параметре Дебая-Валлера  $12 \text{ \AA}^2$  – на кристаллах с линейным размером порядка 70 элементарных ячеек ( $\sim 200 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^3$  фотонов на  $\text{\AA}^2$  и порядка 10 ячеек ( $\sim 30 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^6$  фотонов на  $\text{\AA}^2$ ;
- 3) при параметре Дебая-Валлера  $3.5 \text{ \AA}^2$  – на кристаллах с линейным размером порядка 40 элементарных ячеек ( $\sim 120 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^3$  фотонов на  $\text{\AA}^2$  и порядка 7 ячеек ( $\sim 20 \text{ нм}$ ) при интенсивности  $10^6$  фотонов на  $\text{\AA}^2$ .

Разрешения порядка  $1 \text{ \AA}$  могут потребовать большего динамического диапазона, вплоть до  $10^8$  для параметра Дебая-Валлера  $28.5 \text{ \AA}^2$ . Кроме того, при текущей интенсивности  $10^3$  фотонов на  $\text{\AA}^2$  такое разрешение достижимо только на достаточно больших кристаллах с линейным размером порядка 30 элементарных ячеек для хорошо упорядоченных кристаллов, порядка 100 ячеек для средне упорядоченных и более 600 ячеек для плохо упорядоченных. Отсюда видна важность повышения пиковой мощности в строящихся рентгеновских лазерах для целей нанокристаллографии.

Из приведенных данных можно сделать вывод, что применение рентгеновских лазеров позволяет исследовать белковые нанокристаллы с линейным размером порядка десятков элементарных ячеек и, при дальнейшем развитии технологии, возможно, до нескольких элементарных ячеек. Это на 1-3 порядка меньшие размеры (на 3-9 порядков меньше объемы) кристаллов, чем минимальные пригодные для синхротронов (линейный размер порядка 1000 элементарных ячеек). Появление таких возможностей может позволить исследовать ряд мембранных белков, а также макромолекулярных комплексов, из которых проблематично вырастить кристалл с большим числом элементарных ячеек.

## Выводы

Рентгеновские лазеры на свободных электронах открывают широкие перспективы исследований, неосуществимых на синхротронах. Сюда относятся дифракция на нанокристаллах и некристаллических частицах, вплоть до одиночных макромолекул и их комплексов. Как показывает проведенное моделирование с учетом эффектов радиационного повреждения, даже характеристики уже имеющихся лазеров дают возможность исследовать кристаллы с линейным размером на два порядка меньше, чем наименьшие кристаллы, пригодные для получения дифракционной картины на синхротронах. В будущем можно ожидать дальнейшего роста возможностей рентгеновских лазеров. Это может позволить существенно расширить круг известных биологических структур, имеющих ключевое значение для медицины, биотехнологий и фундаментальных вопросов биологии. Кроме того, рентгеновские лазеры открывают беспрецедентные возможности исследования малых квантовых систем (атомов, ионов, молекул, кластеров) в интенсивных высокочастотных электромагнитных полях.

Авторы выражают свою признательность Министерству образования и науки Российской Федерации, предоставившему финансовую помощь для проведения данного исследования (Госконтракт № 07.514.11.4126).

Работа частично поддержана РФФИ (гранты 12-04-31915 и 13-04-00118), а также грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых, в ФГБОУ ВПО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" по договору № 11.G34.31.0054.

### **Литература**

1. Emma P. et al., First lasing and operation of an ångstrom-wavelength free-electron laser // Nature Photonics, 2010, **4**, 641–647.
2. Paul Scherrer Institut, Ultrafast Phenomena at the Nanoscale: Science Opportunities at the SwissFEL X-ray Laser // Paul-Scherrer-Institut PSI, 2009, 108 pp.
3. Hunter M.S., DePonte D.P., Shapiro D.A., Kirian R.A., Wang X., Starodub D., Marchesini S., Weierstall U., Doak R.B., Spence J.C.H., Fromme P., X-ray Diffraction from Membrane Protein Nanocrystals // Biophysical Journal, 2011, **100**, 198–206.
4. Slabinski L., Jaroszewski L., Rychlewski L., Wilson I.A., Lesley S.A., Godzik A., XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability // Bioinformatics, 2007, **23** (24), 3403-3405.
5. Гинзбург В.Л., Об излучении микрорадиоволн и их поглощении в воздухе // Изв. АН СССР. Сер. физ., 1947, **XI** (2), 165-181.
6. Гинзбург В.Л., Теоретическая физика и астрофизика // Наука, Москва, 1981.
7. Кулипанов Г.Н., Изобретение В.Л. Гинзбургом ондуляторов и их роль в современных источниках синхротронного излучения и лазерах на свободных электронах // УФН, 2007, **177** (4), 384-393.
8. Бессонов Е.Г., Виноградов А.В., Ондуляторные и лазерные источники мягкого рентгеновского излучения // УФН, 1989, **159** (1), 143-154.
9. Алферов Д.Ф., Башмаков Ю.А., Черенков П.А., Излучение релятивистских электронов в магнитном ондуляторе // УФН, 1989, **157** (3), 389-436.
10. Elias L.R., Fairbank W.M., Madey J.M.J., Schwettman H.A., Smith T.I., Observation of Stimulated Emission of Radiation by Relativistic Electrons in a Spatially Periodic Transverse Magnetic Field // Phys. Rev. Lett., 1976, **36** (13), 717-720.
11. Винокуров Н.А., Состояние дел и перспективы лазера на свободных электронах Сибирского центра фотохимических исследований, <http://www.kinetics.nsc.ru/center/public/st05.pdf>.
12. Vinokurov N.A., Free Electron Lasers as a High-Power THz Sources // Journal of infrared, millimeter and terahertz waves, 2012, **32** (10), 1123-1143.
13. Винокуров Н.А., Лазеры на свободных электронах, [http://accel.inp.nsk.su/library/FEL\\_lections.pdf](http://accel.inp.nsk.su/library/FEL_lections.pdf).
14. Князев Б.А., Кузьмин А.В., Поверхностные электромагнитные волны: от видимого диапазона до микроволн // Вестник НГУ. Серия физика, 2007, **2** (1), 108-122.
15. Kozlov A.S., Petrov A.K., Vinokurov N.A., Study of nanoobjects of different nature using sublimeter laser ablation // Optoelectronics, Instrumentation and Data Processing, 2011, **47** (4), 321 - 331.
16. Kondratenko A.M., Saldin E.L., Generating Of Coherent Radiation By A Relativistic Electron Beam In An Ondulator // Particle Accel., 1980, **10**, 207-216.
17. Saldin E.L., Schneidmiller E.A., Yurkov M.V., The Physics of Free Electron Lasers. An Introduction // Physics Reports, 1995, **260**, 187-327.
18. Pellegrini C., The history of X-ray free-electron lasers // Eur. Phys. J. H, 2012, **37**, 659-708.
19. Kapiza P.L., Dirac P.A.M., The reflection of electrons from standing light waves // Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, 1933, **29**, 297-300.
20. Feldhaus J., Saldin E.L., Schneider J.R., Schneidmiller E.A., Yurkov M.V., Possible application of X-ray optical elements for reducing the spectral bandwidth of an X-ray SASE FEL // Optics Communications, 1997, **140**, 341-352.
21. Allaria E. et al., Highly coherent and stable pulses from the FERMI seeded free-electron laser in the extreme ultraviolet // Nature Photonics, 2012, **6**, 699-704.
22. Amann J. et al., Demonstration of self-seeding in a hard-X-ray free-electron laser // Nature Photonics 2012, **6**, 693-698.
23. Ayvazyan V. et al., First operation of a free-electron laser generating GW power radiation at 32 nm wavelength // Eur. Phys. J. D, 2006, **37**, 297–303.
24. Ackermann W. et al., Operation of a free-electron laser from the extreme ultraviolet to the water window // Nature Photonics, 2007, **1**, 336–342.

25. Bostedt C. et al., Experiments at FLASH // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2009, **601**, 108-122.
26. Shintake T. et al., A compact free-electron laser for generating coherent radiation in the extreme ultraviolet region // Nature Photonics, 2008, **2**, 555–559.
27. Bozek J.D., AMO instrumentation for the LCLS x-ray FEL // Eur. Phys. J. Special Topics, 2009, **169**, 129-132.
28. Pile D. et al., First light from SACLA // Nature Photonics, 2011, **5**, 456–457.
29. Ishikawa T., A compact X-ray free-electron laser emitting in the sub-ångström region // Nature Photonics, 2012, **6**, 540-544.
30. Young L. et al., Femtosecond electronic response of atoms to ultra-intense X-rays // Nature, 2010, **466**, 56-61.
31. Berah N. et al., Non-linear processes in the interaction of atoms and molecules with intense EUV and X-ray fields from SASE free electron lasers (FELs) // J. Mod. Opt., 2010, **57**, 1015-1040.
32. Doumy G. et al., Nonlinear Atomic Response to Intense Ultrashort X Rays // Phys. Rev. Lett., 2011, **106**, 083002(1)-083002(4).
33. Rudek B. et al., Ultra-efficient ionization of heavy atoms by intense X-ray free-electron laser pulses // Nature Photonics, 2012, **6**, 858-865.
34. Rohringer N. et al., Atomic inner-shell X-ray laser at 1.46 nanometres pumped by an X-ray free-electron laser // Nature, 2012, **481**, 488-491.
35. Cryan J.P. et al., Auger Electron Angular Distribution of Double Core-Hole States in the Molecular Reference Frame // Phys. Rev. Lett., 2010, 105, 083004(1)-083004(5).
36. Fang L. et al., Double Core-Hole Production in N<sub>2</sub>: Beating the Auger Clock // Phys. Rev. Lett., 2010, 105, 083005(1)-083005(5).
37. Kurka M. et al. Two-photon double ionization of Ne by free-electron laser radiation: a kinematically complete experiment // J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys., 2009, **42**, 141002(1)-141002(5).
38. Fukuzawa H. et al., Photoelectron spectroscopy of sequential three-photon double ionization of Ar irradiated by EUV free-electron laser pulses // J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys., 2010, **43**, 111001(1)-111001(4).
39. Rouzée A. et al., Angle-resolved photoelectron spectroscopy of sequential three-photon triple ionization of neon at 90.5 eV photon energy // Phys. Rev. A, 2011, **83**, 031401(R)(1)-031401(R)(4).
40. Gryzlova E.V. et al., Doubly resonant three-photon double ionization of Ar atoms induced by an EUV free-electron laser // Phys. Rev. A, 2011, **84**, 063405(1)-063405(4).
41. Hoerner M. et al., Ultraintense X-Ray Induced Ionization, Dissociation, and Frustrated Absorption in Molecular Nitrogen // Phys. Rev. Lett., 2010, **104**, 253002(1)-083002(5).
42. Fang L. et al., Multiphoton Ionization as a clock to Reveal Molecular Dynamics with Intense Short X-ray Free Electron Laser Pulses // Phys. Rev. Lett., 2012, **109**, 263001(1)-263001(5).
43. Erk B. et al., Ultrafast Charge Rearrangement and Nuclear Dynamics upon Inner-Shell Multiple Ionization of Small Polyatomic Molecules // Phys. Rev. Lett., 2013, **110**, 053003(1)-053003(5).
44. Thomas H. et al., Explosions of Xenon Clusters in Ultraintense Femtosecond X-Ray Pulses from the LCLS Free Electron Laser // Phys. Rev. Lett., 2012, **108**, 133401(1)-133401(5).
45. Bostedt C. et al., Ultrafast X-Ray Scattering of Xenon Nanoparticles: Imaging Transient States of Matter // Phys. Rev. Lett., 2012, **108**, 093401(1)-093401(5).
46. Gorkhover T. et al., Nanoplasma Dynamics of Single Large Xenon Clusters Irradiated with Superintense X-Ray Pulses from the Linac Coherent Light Source Free-Electron Laser // Phys. Rev. Lett., 2012, **108**, 245005(1)-245005(5).
47. Schorb S. et al., Size-Dependent Ultrafast Ionization Dynamics of Nanoscale Samples in Intense Femtosecond X-Ray Free-Electron-Laser Pulses // Phys. Rev. Lett. 108, 233401(1)-233401(5) (2012).
48. Bogan M.J., Starodub D., Hampton C.Y., Sierra R.G., Single-particle coherent diffractive imaging with a soft x-ray free electron laser: towards soot aerosol morphology // J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys., 2010, **43**, 194013(1)-194013(13).
49. Loh N.D. et al., Fractal morphology, imaging and mass spectrometry of single aerosol particles in flight // Nature, 2012, **486**, 513-517.
50. Harmand M. et al., Achieving few-femtosecond time-sorting at hard X-ray free-electron lasers // Nature Photonics, 2013, **7**, 215-218.
51. Meyer M. et al., Two-colour experiments in the gas phase // J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys., 2010, **45**, 194006(1)-194006(11).
52. Meyer M. et al., Angle-Resolved Electron Spectroscopy of Laser-Assisted Auger Decay Induced by a Few-Femtosecond X-Ray Pulse // Phys. Rev. Lett., 2012, **108**, 063007(1)-063007(5).
53. Cryan J.P. et al., Molecular frame Auger electron energy spectrum from N<sub>2</sub> // J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys., 2012, **45**, 055601(1)-055601(8).

54. Katayama T. et al., Ultrafast soft X-ray emission spectroscopy of surface adsorbates using an X-ray free electron laser // J. Electr. Spectrosc. Rel. Phenom., 2013, **187**, 9-14.
55. Ullrich J., Rudenko A., Moshammer R., Free-Electron Lasers: New Avenues in Molecular Physics and Photochemistry // Annu. Rev. Phys. Chem., 2012, **63**, 635–660.
56. Frisch J., Synchrotron Radiation Sources and Free Electron Lasers, [https://portal.slac.stanford.edu/sites/lclscore\\_public/ape/Documents/X\\_ray\\_tutorial\\_UXSS\\_11.pptx](https://portal.slac.stanford.edu/sites/lclscore_public/ape/Documents/X_ray_tutorial_UXSS_11.pptx).
57. Geloni G., Kocharyan V., Saldin E., Scheme for generation of fully-coherent, TW power level hard X-ray pulses from baseline undulators at the European X-ray FEL // <http://arxiv.org/abs/1007.2743v1>.
58. Krause M.O., Atomic Radiative and Radiationless Yields for K and L Shells // J. Phys. Chem. Ref. Data, 1979, **8**, 307-327.
59. Caleman C. et al., On the Feasibility of Nanocrystal Imaging Using Intense and Ultrashort X-ray Pulses // ACS NANO, 2011, **5**, 139-146.
60. Hau-Riege S. P., London R.A., Szoke A., Dynamics of biological molecules irradiated by short X-ray pulses // Phys. Rev. E., 2004, **69**, 051906, 12 pp.
61. Neutze R., Wouts R., van der Spoel D., Weckert E., Hajdu J., Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses // Nature, 2000, **406**, 752-757.
62. Jurek Z., Faigel G., Tegze M., Dynamics in a cluster under the influence of intense femtosecond hard X-ray pulses // Eur. Phys. J. D, 2004, **29**, 217-229.
63. Bergh M., Timneanu N.O., van der Spoel D., Model for the dynamics of a water cluster in an x-ray free electron laser beam // Phys. Rev. E, 2004, **70**, 051904.
64. Chapman H.N. et al., Femtosecond diffractive imaging with a soft-X-ray free-electron laser // Nature Physics, 2006, **2**, 839–843.
65. Chapman H.N. et al., Femtosecond X-ray protein nanocrystallography // Nature, 2011, **470**, 73-77.
66. Lomb L. et al., Radiation damage in protein serial femtosecond crystallography using an x-ray free-electron laser // Phys. Rev. B, 2011, **84**, 214111(1)-214111(6).
67. Boutet S. et al., High resolution protein structure determination by serial femtosecond crystallography // Science, 2012, **337**, 362-364.
68. Redecke L. et al., Natively Inhibited Trypanosoma brucei Cathepsin B Structure Determined by Using an X-ray Laser // Science, 2013, **339** (6116), 227-230.
69. Kern J. et al., Simultaneous Femtosecond X-ray Spectroscopy and Diffraction of Photosystem II at Room Temperature // Science, 2013, **340** (6131), 491-495.
70. Barty A. et al., Self-terminating diffraction gates femtosecond X-ray nanocrystallography measurements // Nature Photonics, 2012, **6**, 35-40.
71. Son S.-K., Young L., Santra R., Impact of hollow-atom formation on coherent x-ray scattering at high intensity // Phys. Rev. A, 2011, **83**, 033402, 12 pp.
72. Lorenz U., Kabachnik N.M., Weckert E., Vartanyants I.A., Impact of ultrafast electronic damage in single-particle x-ray imaging experiments // Phys. Rev. E, 2012, **86**, 051911, 7 pp.
73. Leonov A., Ksenzov D., Benediktovich A., Feranchuk I., Pietsch U., Time dependence of X-ray diffraction intensity of a crystal caused by electron redistribution induced by intense femtosecond X-ray pulse // arXiv:1302.4848, 2013, <http://arxiv.org/abs/1302.4848>.
74. Лунин В.Ю., Грум-Гржимайло А.Н., Грызлова Е.В., Синицын Д.О., Балабаев Н.К., Лунина Н.Л., Петрова Т.Е., Терешкина К.Б., Абдулнасыров Э.Г., Степанов А.С., Крупянский Ю.Ф. Компьютерное моделирование дифракции импульсов рентгеновских лучей на нанокристаллах биологических макромолекул с использованием унитарной аппроксимации нестационарных факторов атомного рассеяния // Математическая биология и биоинформатика, 2013, **8** (1), 93-118.
75. Вайнштейн Б.К., Современная кристаллография (в четырех томах). Том 1. Симметрия кристаллов. Методы структурной кристаллографии // М.: Наука, 1979.
76. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М., Механика // М.: Наука, 1973, 208 с.
77. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М., Теория поля // М.: Наука, 1973, 504 с.
78. Greiffenberg D., The AGIPD detector for the European XFEL // 13th International Workshop on Radiation Imaging Detectors, Published by IOP Publishing for SISSA, 2011.

# X-RAY FREE ELECTRON LASERS AND NEW POSSIBILITIES FOR VISUALIZATION OF OBJECTS OF NANO- AND MICRO-WORLD

D.O. Sinitsyn<sup>\*1</sup>, V.Yu. Lunin<sup>2</sup>, A.N. Grum-Grzhimailo<sup>3</sup>,  
E.V. Gryzlova<sup>3</sup>, N.K. Balabaev<sup>2</sup>, N.L. Lunina<sup>2</sup>, T.E. Petrova<sup>2</sup>,  
K.B. Tereshkina<sup>1</sup>, E.G. Abdulnasyrov<sup>1</sup>, A.S. Stepanov<sup>1</sup>,  
Yu.F. Krupyanskii<sup>\*\*1</sup>

<sup>1</sup>Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Institute of Mathematical Problems of Biology, Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow Region

<sup>3</sup>Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow

\*d\_sinitsyn@mail.ru, \*\* yufk@chph.ras.ru

Received 12.06.2013

We consider the properties of new sources of radiation – X-ray free electron lasers. We describe the properties of the ultra-intense ultra-short X-ray pulses generated by them, the specific properties of diffraction experiments on these facilities and new possibilities they open in crystallography. Based on the performed modeling of the diffraction of the pulses typical for X-ray lasers on nanocrystals of biological macromolecules with an account of the processes of radiation damage of the sample, we obtain estimates of the maximal resolutions attainable for different values of the parameters of experimental equipment and the crystals under study. These results demonstrate a considerable extension of the possibilities of X-ray structure analysis with the use of X-ray lasers compared to third generation synchrotrons.