

ГЕТЕРОАССОЦИАЦИЯ МОЛЕКУЛ КОФЕИНА И ФЕНАНТРИДИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

С. Ф. Барановский*, Д. Н. Чернышев

УДК 543.42.062:(577.113+547.857.4)

Севастопольский государственный университет,
299053, Севастополь, ул. Университетская, 33, Россия; e-mail: sfbar@yandex.ru

(Поступила 20 декабря 2017)

Экспериментальные результаты исследования ассоциации молекул бромистого этидия и кофеина в водном растворе методом спектрофотометрии проанализированы с применением димерной модели гетероассоциации молекул, определены равновесные константы ассоциации молекул. Выполнено разложение экспериментального спектра поглощения смеси гетероциклических молекул на индивидуальные компоненты с использованием метода регуляризации. По данным индивидуальных составляющих спектра получена количественная информация о структуре гетерокомплекса: расстояние и угол между точечными дипольными моментами переходов разнородных молекул 0.3 нм и 16°. Расчет относительного содержания ассоциатов различного типа в смешанном растворе показывает, что гетероассоциация молекул приводит к уменьшению эффективной концентрации бромистого этидия и, соответственно, к меньшей мутагенной активности красителя.

Ключевые слова: спектрофотометрия, поглощение, краситель, кофеин, мономер, димер, константы ассоциации, дипольный момент перехода, структурные параметры.

Results of spectrophotometric research of the association of ethidium bromide and caffeine molecules in aqueous solution are presented. Experimental data were analyzed using a dimer model of heteroassociation of molecules. Numerical values of the equilibrium constants of association of molecules were defined. The experimental spectrum of absorption of a mixture of heterocyclic molecules was decomposed into individual components using the regularization method. Quantitative information on the heterocomplex structure based on the individual spectrum components was obtained – the distance and the angle between the point dipole moments of the transitions of heterogeneous molecules are 0.3 nm and 16°. Calculation of the relative content of different types of associates in a mixed solution shows that heteroassociation of molecules leads to a decrease in the effective concentration of ethidium bromide and, accordingly, to a lesser mutagenic activity of a dye.

Keywords: spectrophotometry, absorption, dyes, caffeine, monomer, dimer, association constant, transition dipole moment, structural parameters.

Введение. Исследование закономерностей процессов разнородной ассоциации гетероциклических молекул, характера равновесия между мономерными и ассоциированными формами, установления структурных особенностей гетерокомплексов важно для понимания взаимодействия подобных молекул как между собой, так и с биополимерами и их компонентами. Фенантридиновый краситель — бромистый этидий (ЭБ) — относится к наиболее изученным представителям биологически активных низкомолекулярных гетероциклических веществ. Известно, что ЭБ связывается с двойной спиралью ДНК [1] и благодаря своим уникальным спектроскопическим свойствам на протяжении многих лет служит “маркером” при исследовании конденсированных состояний ДНК в клетках. Кофеин (1,3,7-триметилксантин) широко используется как психомоторный стимулятор [2]. Принято считать, что биологическая активность кофеина связана с его взаимодействием с белками и ДНК [2]. В то же

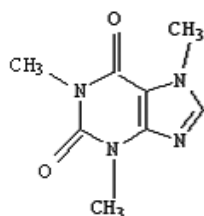
HETEROASSOCIATION OF CAFFEINE AND PHENANTHRIDINONE DYE MOLECULES IN AQUEOUS SOLUTION

S. F. Baranovskiy*, D. N. Chernyshev (Sevastopol State University, 33 Universitetskaya Str., Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: sfbar@yandex.ru)

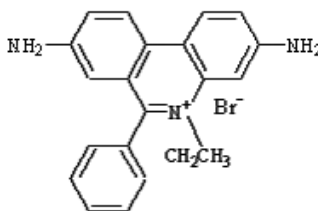
время кофеин уменьшает цитотоксичное действие некоторых красителей, например ЭБ, о чем свидетельствуют экспериментальные результаты исследований в клеточных системах [3]. В работе [4] сделан вывод, что кофеин является комплексообразователем — интерцептором ароматических биологически активных веществ, связывающихся с ДНК путем интеркаляции, уменьшая их эффективную концентрацию. Изучение гетероассоциации кофеина с биологически активными веществами, определение характера равновесия между различными молекулярными формами и их структурных параметров важны для анализа механизма конкурентного связывания этих молекул с нуклеиновыми кислотами в растворе [5]. Следует также отметить, что кофеин является гидротропным агентом, т. е. увеличивающим растворимость биологически активных веществ в водном растворе [6].

В данной работе изучена ассоциация ЭБ и кофеина наиболее чувствительным методом исследования нековалентного связывания молекул — электронной спектроскопией, позволяющей количественно оценить параметры образующихся ассоциатов [7—12]. При интерпретации экспериментальных данных использована димерная модель, в которой рассматриваются реакции димеризации для самоассоциации и образования комплексов 1:1 при гетероассоциации молекул.

Методика эксперимента. Электронные спектры поглощения растворов зарегистрированы на спектрофотометрах СФ-46 и UNICO UV-Vis 4802 (США) в видимой области при температуре 298 К. Краситель ЭБ и кофеин (Sigma, США) использованы в экспериментах без дополнительной очистки.



Кофеин



Бромистый этидий

При титровании ЭБ взяты растворы кофеина концентраций в пределах $1 \cdot 10^{-4}$ — $4 \cdot 10^{-2}$ М. Измерения проведены в стандартных стеклянных кюветах с длиной оптического пути 2.0, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 см и одноразовых пластиковых кюветах, которые термостатировались в кюветном отделении спектрофотометра жидкостным термостатом с точностью ± 0.25 К. Концентрация ЭБ в смешанном растворе поддерживалась постоянной ($[P_0] = 5 \cdot 10^{-5}$ М). Растворы красителя и кофеина готовились в 0.1 М Na-фосфатном буфере (рН 6.7) с применением бидистиллированной воды.

Результаты и их обсуждение. Самоассоциация бромистого этидия в водном растворе. Анализ самоассоциации красителя в растворе проведен, как и в [8, 9], на основе экспериментальной концентрационной зависимости молярного коэффициента поглощения молекул ЭБ на длине волны, соответствующей максимуму поглощения красителя в мономерной форме. Равновесие моделировалось схемой: $P_1 + P_1 \xrightleftharpoons{K_d} P_2$, где K_d — равновесная константа димеризации молекул, P_1 и P_2 — мономерная и димерная формы молекул ЭБ. Экспериментальный молярный коэффициент экстинкции ϵ описан выражением [8]: $\epsilon = \epsilon_m f_m + \epsilon_d f_d$, где ϵ_m , ϵ_d — коэффициенты молярного поглощения мономеров и молекул ЭБ в составе димеров; f_m , f_d — равновесные доли молекул в мономерной и димерной формах. Параметры ϵ_m , ϵ_d и K_d найдены путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных молярных показателей поглощения от значений, рассчитанных по модели. Получены следующие параметры: $K_d = 240 \pm 70 \text{ М}^{-1}$, $\epsilon_m = 6050 \pm 80 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и $\epsilon_d = 2820 \pm 370 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Значение K_d согласуется с результатами, полученными методом ЯМР-спектроскопии [13] в близких условиях растворителя. Равновесная константа димеризации кофеина $K_d = 22 \pm 7 \text{ л/моль}$ рассчитана аналогично по экспериментальным данным [14].

Гетероассоциация бромистого этидия и кофеина в водном растворе. На рис. 1 представлены экспериментальные спектры водных растворов ЭБ с различным содержанием кофеина. Как видно, титрование ЭБ кофеином приводит к гипохромному эффекту и батохромному сдвигу полосы поглощения относительно максимума мономерной полосы красителя (480 нм) с одновременным появлением изобестической точки на $\lambda = 500$ нм. Изменения в спектрах красителя и наличие изобестической точки свидетельствуют о присутствии специфических взаимодействий между молекулами ЭБ и кофеина и формировании в водном растворе гетерокомплексов [15].

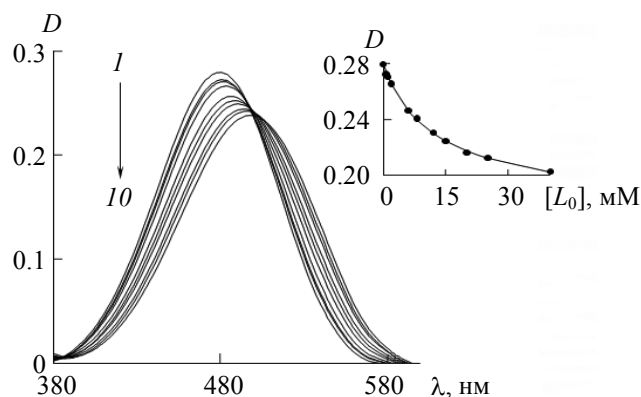
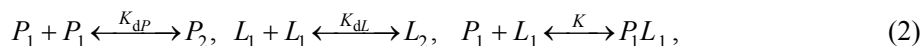


Рис. 1. Спектры поглощения водного раствора бромистого этидия ($[P_0] = 5 \cdot 10^{-5}$ М) при концентрациях кофеина 0 (1), $6.67 \cdot 10^{-4}$ (2), $1 \cdot 10^{-3}$ (3), $2 \cdot 10^{-3}$ (4), $4 \cdot 10^{-3}$ (5), $6 \cdot 10^{-3}$ (6), $8 \cdot 10^{-3}$ (7), $1.2 \cdot 10^{-2}$ (8), $1.5 \cdot 10^{-2}$ (9), $2 \cdot 10^{-2}$ М (10); на вставке — зависимость оптической плотности бромистого этидия на длине волны 480 нм от концентрации кофеина

Динамическое равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K_{dP} , K_{dL} и K — равновесные константы димеризации молекул ЭБ, кофеина и их гетероассоциации соответственно; P_1 , P_2 и L_1 , L_2 — мономеры и димеры молекул ЭБ и кофеина; P_1L_1 — гетерокомплекс. Уравнения материального баланса исследуемых молекул в состоянии равновесия имеют вид [16]:

$$2K_{dP}[P_1]^2 + K[P_1][L_1] + [P_1] - [P_0] = 0, \quad 2K_{dL}[L_1]^2 + K[P_1][L_1] + [L_1] - [L_0] = 0, \quad (3)$$

где $[P_0]$, $[L_0]$ — исходные молярные концентрации ЭБ и кофеина; $[P_1]$, $[L_1]$ — равновесные молярные концентрации лигандов в мономерной форме. Экспериментальное поглощение исследуемых растворов описывается выражением:

$$A = A_1 + A_2, \quad (4)$$

где A_1 и A_2 — оптические плотности свободных и связанных молекул ЭБ и кофеина при толщине поглощающего слоя исследуемых растворов 1 см:

$$A_1 = \varepsilon_m^P [P_1] + 2\varepsilon_d^P K_{dP}[P_1]^2 + \varepsilon_k^P K[P_1][L_1], \quad A_2 = \varepsilon_m^L [L_1] + 2\varepsilon_d^L K_{dL}[L_1]^2 + \varepsilon_k^L K[P_1][L_1]. \quad (5)$$

Здесь ε_m^P , ε_d^P , ε_m^L , ε_d^L — коэффициенты молярного поглощения лигандов P и L в мономерной и димерной формах соответственно; ε_k^P , ε_k^L — коэффициенты молярного поглощения ЭБ и кофеина в составе гетерокомплекса. Параметры ε_m^P , ε_d^P , ε_m^L , ε_d^L , K_{dP} и K_{dL} определены из независимых экспериментов по самоассоциации в аналогичных условиях растворителя. Таким образом, в уравнение (4) входят параметры ε_k и K , которые можно определить по экспериментальной концентрационной зависимости молярного показателя поглощения (рис. 1, вставка). Оценка дает $K = 72 \pm 9 \text{ М}^{-1}$, $\varepsilon_k = (4.1 \pm 0.3) \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, константа K принимает промежуточное значение между равновесными константами димеризации ЭБ и кофеина.

С использованием значений K_{dP} , K_{dL} и K рассчитано содержание различных молекулярных форм в водном растворе в зависимости от $r = [L_0]/[P_0]$ (рис. 2). Как видно, с увеличением r возрастают концентрации гетерокомплексов, димерных комплексов кофеина и уменьшается относительное содержание мономеров кофеина и ЭБ. Удельный вес димеров ЭБ мал и практически не изменяется во всем диапазоне r (кривая 5). При $r \geq 200$ содержание гетероассоциатов в растворе превышает эффективную концентрацию свободного красителя (>50 % молекул ЭБ находится в составе гетерокомплексов), что, очевидно, должно приводить к уменьшению биологической активности ЭБ.

Ассоциация исследуемых молекул существенно влияет на интенсивность и положение полос их спектров поглощения — они зависят от взаимного расположения мономеров в димерных комплексах. Поэтому из спектров поглощения ассоциатов можно получить информацию о структуре димеров. Для оценки структурных параметров гетерокомплексов использованы их спектры, выделенные из

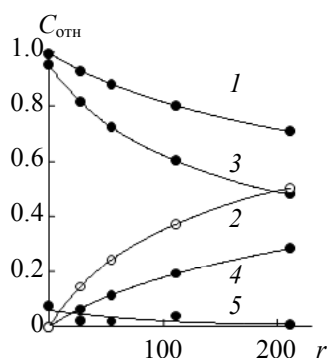


Рис. 2. Расчетные зависимости относительного содержания различных молекулярных форм бромистого этидия и кофеина в водном растворе от соотношения их концентраций $r = [L_0]/[P_0]$: 1 — мономер кофеина; 2 — гетерокомплекс ЭБ-кофеин; 3 — мономер ЭБ; 4 — димер кофеина; 5 — димер ЭБ

экспериментальных спектров (рис. 1), в составе пяти компонентов (двух мономерных и трех димерных). Индивидуальные составляющие (ϵ_{mi}^P , ϵ_{mi}^L , ϵ_{di}^P , ϵ_{di}^L , ϵ_{ki}) получены при совместной обработке экспериментальных данных (рис. 1) с использованием равновесных констант K , K_{dP} , K_{dL} . Поиск спектральных составляющих, принадлежащий к классу обратных задач, осуществлен путем минимизации функционала:

$$S = \sum_j \sum_i (A_{ji}^\delta - A_{ji})^2, \quad (6)$$

где A_{ij}^δ — экспериментальные оптические плотности растворов, измеренные с погрешностью δ ; A_{ji} — расчетные оптические плотности растворов; j — номер спектра (концентрации); i — номер оптической плотности, соответствующей λ_i .

При выполнении вычислительной процедуры обработки экспериментальных спектров задача поиска индивидуальных составляющих (или минимизации функционала (6)) заменялась несколькими задачами меньшей размерности. Спектральные характеристики раствора, согласно их физическому смыслу, объединены в три группы, содержащие одинаковое количество параметров. Одной группой параметров ϵ_{ai} описывается поглощение молекул в ассоциированной форме, остальными (ϵ_{mi}^P и ϵ_{mi}^L) — поглощение молекул в свободной форме. Минимизация функционала выполнена варьированием спектральных параметров каждой группы в отдельности при фиксированных параметрах остальных групп. На начальном этапе минимизации параметрам ϵ_{mi}^P и ϵ_{mi}^L присваивались значения, полученные ранее при изучении самоассоциации молекул ЭБ и кофеина. Параметры ϵ_{ai} вычислены путем их варьирования до тех пор, пока они не стабилизировались при некотором минимальном значении суммы (6). На следующих этапах минимизации варьируются другие спектральные характеристики, а две оставшиеся группы параметров фиксируются. С учетом положения оптимума суммы (6) в многомерном пространстве спектральные характеристики ϵ_{ai} , обобщенно отражающие ассоциацию молекул, представляются тремя группами параметров ϵ_{ki} , ϵ_{di}^L и ϵ_{di}^P , описывающими поглощение молекул в составе димеров P_1L_1 , P_2 и L_2 . При замене исходной задачи пятью подзадачами сумма квадратов невязок (6) дополняется регуляризирующим членом [17]:

$$S = \sum_j \sum_i (A_{ji}^\delta - A_{ji})^2 + \text{reg}(\epsilon_d^P, \epsilon_m^P, \epsilon_k^P \alpha), \quad (7)$$

где α — коэффициент регуляризации. Регуляризирующий член, состоящий из трех слагаемых

$$\text{reg}(\epsilon_d^P, \epsilon_m^P, \epsilon_k^P \alpha) = \alpha((\epsilon_m^P - \epsilon_{m480}^P)^2 + (\epsilon_d^P - \epsilon_{d480}^P)^2 + (\epsilon_k^P - \epsilon_{k480}^P)^2), \quad (8)$$

содержит коэффициент регуляризации α и значения ϵ_m^P , ϵ_d^P , ϵ_k^P , полученные ранее на $\lambda = 480$ нм (ϵ_{m480}^P , ϵ_{d480}^P и ϵ_{k480}^P). Регуляризирующее звено делает функционал (7) более выпуклым — с выраженным минимумом, позволяющим более точно определить компоненты спектра поглощения смеси ЭБ и кофеина. Выбор регуляризирующего решения осуществлен при условии, что невязка не превышает δ и $\text{reg}(\epsilon_m^P, \epsilon_d^P, \epsilon_k^P \alpha) = \min$.

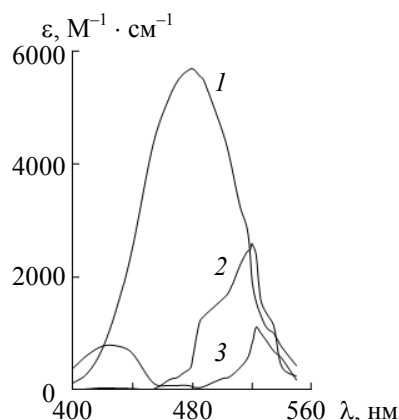


Рис. 3. Отдельные компоненты спектра поглощения смеси бромистого этидия и кофеина в водном растворе ($[P_0] = 5.0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[L_0] = 2.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$): 1 — мономеры ЭБ; 2 — разнородные димеры ЭБ + кофеин; 3 — однородные димеры ЭБ + ЭБ

Заданная точность решения достигается в ходе последовательного уточняющего поиска спектральных характеристик, состоящего из решения пяти подзадач минимизации функционала (7). Полученному минимуму функционала соответствует набор спектральных (индивидуальных) составляющих экспериментального спектра (рис. 3). На рис. 3 составляющие ε_{mi}^L и ε_{di}^L не представлены, так как в исследуемом диапазоне длин волн молярные коэффициенты поглощения кофеина в свободном и димерном состояниях на два-три порядка меньше ε_{mi}^P , т. е. оценка пространственных параметров гетерокомплекса проведена по ε_{mi}^P и ε_{ki} . Из сопоставления экспериментальных и расчетных данных следует, что при разнородной ассоциации происходит сдвиг полосы поглощения красителя. Максимум спектра поглощения ЭБ, входящего в состав гетерокомплекса, смещен относительно полосы свободных молекул ЭБ (480 нм) в длинноволновую сторону на 40 нм (кривая 2). Димерная составляющая $\varepsilon_d^P(\lambda_i)$ (кривая 3) содержит две полосы поглощения, смещенные в разные стороны по отношению к максимуму поглощения мономеров ЭБ.

Согласно квантово-механическому рассмотрению диполь-дипольного взаимодействия разнородных молекул, длину волны полосы поглощения ЭБ ($\lambda = 520 \text{ нм}$) в составе гетерокомплекса можно представить в виде [18—20]:

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{1}{\lambda_{\text{ЭБ}}} + \frac{2\lambda_{\text{ЭБ}}^2 \lambda_{\text{коф}} \mu_{\text{ЭБ}}^2 \mu_{\text{коф}}^2 G^2}{(\lambda_{\text{коф}}^2 - \lambda_{\text{ЭБ}}^2) h^2 c^2}, \quad (9)$$

где $\mu_{\text{ЭБ}}$ и $\mu_{\text{коф}}$ — дипольные моменты переходов мономеров молекул ЭБ и кофеина на длинах волн $\lambda_{\text{ЭБ}}$ и $\lambda_{\text{коф}}$, соответствующих максимумам поглощения молекул в свободном состоянии; c — скорость света; h — постоянная Планка; G — геометрический фактор, зависящий от взаимного расположения дипольных моментов переходов разнородных мономеров в составе гетерокомплекса: $G = (\cos\varphi - 3\cos\theta_{\text{ЭБ}} \cos\theta_{\text{коф}})/4\pi\varepsilon_0\varepsilon R^3$, φ — угол между дипольными моментами переходов молекул ЭБ и кофеина в составе гетерокомплекса; R — расстояние между точечными дипольными моментами переходов молекул ЭБ и кофеина; $\theta_{\text{ЭБ}}$, $\theta_{\text{коф}}$ — углы между вектором R , соединяющим $\mu_{\text{ЭБ}}$ и $\mu_{\text{коф}}$, и векторами этих дипольных моментов; ε_0 , ε — электрическая постоянная и диэлектрическая проницаемость среды.

Интенсивность полосы ЭБ (f) в составе гетерокомплекса можно описать выражением [18—20]:

$$\frac{f}{f_{\text{ЭБ}}} = 1 + \frac{4}{hc} \frac{\lambda_{\text{ЭБ}}^2 \lambda_{\text{коф}} \mu_{\text{коф}}^2 G}{\lambda_{\text{коф}}^2 - \lambda_{\text{ЭБ}}^2} \cos\varphi, \quad (10)$$

где f и $f_{\text{ЭБ}}$ — сила осциллятора электронного перехода молекул ЭБ на длине волны максимума поглощения ЭБ в составе гетерокомплекса и на длине волны $\lambda_{\text{ЭБ}}$.

С помощью положения и интенсивности полос поглощения свободного ЭБ и в составе гетерокомплекса (рис. 3) (формулы (9) и (10)) можно оценить структурные параметры разнородного ассоциата, учитывая [21], что ЭБ и кофеин образуют стопочный гетерокомплекс. Оценочные структурные параметры гетерокомплекса: $\theta_{\text{коф}} = \theta_{\text{ЭБ}} = \pi/2$, $\varphi = 16^\circ$, $R = 0.3 \text{ нм}$.

Заключение. При совместной обработке экспериментальных спектров поглощения смеси гетероциклических молекул методом регуляризации с использованием параметров K_{dP} , K_{dL} , K , ε_{m480}^P , ε_{d480}^P и ε_{k480}^P проведено разложение экспериментального спектра на отдельные компоненты. По данным индивидуальных составляющих спектра и формулам (9), (10) получены углы между дипольными моментами переходов молекул бромистого этидия и кофеина и расстояние между плоскостями хромофоров взаимодействующих молекул в гетерокомплексе состава 1:1 в водном растворе. Можно предположить, что основной вклад в стабилизацию гетерокомплекса дает стекинг-взаимодействие молекулы кофеина с хромофором красителя. Гетероассоциация молекул бромистого этидия и кофеина приводит к меньшей эффективной концентрации свободного красителя в растворе и, соответственно, к уменьшению биологической активности бромистого этидия, обладающего мутагенными свойствами. Анализ разнородной ассоциации гетероциклических молекул с различными структурами хромофоров и строением боковых групп и цепей важен для выяснения сиквенс-специфичного взаимодействия лигандов с олигонуклеотидными последовательностями.

- [1] E. E. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, M. J. Waring. The Molecular Basis of Antibiotic Action, London, Wiley (1981) 231—240
- [2] М. Д. Машковский. Лекарственные средства, Москва, Медицина, **2** (1985) 107—108
- [3] Н. Kimura, Т. Aoyama. J. Pharmacobiodyn., **12** (1989) 589—595
- [4] F. Traganos, J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz. Cancer Res., **51** (1991) 3682—3689
- [5] D. B. Davies, D. A. Veselkov, L. N. Djimant, A. N. Veselkov. Eur. Biophys. J., **30** (2001) 354—366
- [6] E. E. Tucker, S. D. Christian. J. Solution Chem., **22** (1993) 1085—1097
- [7] M. Zdunek, J. Piosik, J. Kapuscinski. Biophys. Chem., **84** (2000) 77—85
- [8] С. Ф. Барановский, П. А. Болотин, М. П. Евстигнеев. Журн. прикл. спектр., **73** (2006) 158—163 [S. F. Baranovsky, P. A. Bolotin, M. P. Evstigneev. J. Appl. Spectr., **73** (2006) 171—177]
- [9] С. Ф. Барановский, П. А. Болотин. Журн. прикл. спектр., **74** (2007) 188—194 [S. F. Baranovsky, P. A. Bolotin. J. Appl. Spectr., **74** (2007) 211—218]
- [10] С. Ф. Барановский, П. А. Болотин, М. П. Евстигнеев, Д. Н. Чернышев. Журн. прикл. спектр., **75** (2008) 242—249 [S. F. Baranovsky, P. A. Bolotin, M. P. Evstigneev, D. N. Chernyshev. J. Appl. Spectr., **75** (2008) 251—260]
- [11] И. В. Водолазская, В. В. Крашенинников, А. М. Салецкий. Журн. прикл. спектр., **78** (2011) 165—170 [I. V. Vodolazskaya, V. V. Krasheninnikov, A. M. Saletsky. J. Appl. Spectr., **78** (2006) 149—154]
- [12] N. Rasoulib, N. Sohrabic, D. Ajlood, N. Rezvania. Phys. Chem. Res., **5** (2017) 541—554
- [13] А. Н. Веселков, Л. Н. Дымант, С. Ф. Барановский, П. А. Болотин, Х. Е. Паркес, Д. Дэвис. Хим. физика, **13** (1994) 70—78
- [14] F. Michael, C. Manuel, I. Nerea. Can. J. Cehm., **68** (1990) 1293—1299
- [15] С. Ф. Барановский, П. А. Болотин, М. П. Евстигнеев, Д. Н. Чернышев. Журн. прикл. спектр., **76** (2009) 143—151 [S. F. Baranovsky, P. A. Bolotin, M. P. Evstigneev, D. N. Chernyshev. J. Appl. Spectr., **76** (2009) 132—139]
- [16] А. Н. Веселков, С. Ф. Барановский, Л. Н. Дымант. Хим. физика, **5** (1986) 318—323
- [17] А. Н. Тихонов, В. Я. Арсенин. Методы решения некорректных задач, Москва, Наука (1979) 53—109
- [18] Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот, под ред. Ю. С. Лазуркина, Москва, Наука (1967) 113—125
- [19] J. Tinoco. J. Am. Chem. Soc., **82** (1960) 4785—4790
- [20] W. Rhodes. J. Am. Chem. Soc., **83** (1961) 3609—3617
- [21] Д. А. Веселков, Д. Б. Дэвис, Л. Н. Дымант, А. Н. Веселков. Биополимеры и клетка, **16** (2000) 468—481