

Влияние структурной организации нуклеиновых кислот на взаимодействие с гипохлоритом: АТФР, PolyA и ДНК

© Е.Б. Морошкина, Д.Н. Осинникова, К.И. Павлова, А.М. Поляничко¹

Санкт-Петербургский государственный университет,
190034 Санкт-Петербург, Россия

e-mail: evmorosh@mail.ru, a.polyanichko@spbu.ru

Поступила в редакцию 01.12.2022 г.

В окончательной редакции 13.01.2023 г.

Принята к публикации 18.01.2023 г.

Методами ультрафиолетовой (УФ) и инфракрасной (ИК) спектроскопии проанализировано влияние структуры нуклеиновых кислот (НК) на протекание реакции с гипохлоритом на примере трех наиболее распространенных и биологически значимых типов НК: двунитевой ДНК в В-форме, одонитевой РНК, а также нуклеотид фосфатов. Установлено, что скорость протекания начальной стадии реакции гипохлорита с эндоциклическими атомами азота зависит от наличия/отсутствия комплементарных пар оснований в структуре НК. Вместе с тем полимерная структура НК существенно ускоряет и повышает эффективность последующих стадий реакции, связанных с хлорированием экзоциклических атомов азота и разрушением кольцевой структуры азотистых оснований.

Ключевые слова: УФ поглощение, ИК спектроскопия, гипохлорит, нуклеиновые кислоты.

DOI: 10.21883/OS.2023.06.55922.113-23

Введение

Взаимодействие реакционно-активных хлорсодержащих соединений с различными биоорганическими молекулами, такими как амины, аминокислоты, белки, липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты (НК), находится в фокусе постоянного внимания не только химиков, но и молекулярных биологов, и медиков [1,2]. Особое практическое значение имеет исследование химических механизмов образования различных производных хлора в физиологических условиях. Одними из таких соединений являются гипохлориты — соли хлорноватистой кислоты. Будучи сильным окислителем, хлорноватистая кислота выполняет роль естественного антисептика [3–5]. Ее константа диссоциации $pK_a = 7.59$ [6], поэтому при физиологических значениях pH хлорноватистая кислота находится в растворе как в форме $HOCl$, так и в форме гипохлорита ClO^- . При развитии воспалительных реакций выработка гипохлорита в организме может приводить к повреждению тканей и провоцировать развитие злокачественных новообразований [7,8].

Действие гипохлорита на различные биологические молекулы в живой клетке активно изучается на протяжении ряда лет [1]. В частности, было установлено, что в ходе реакций гипохлорита с НК происходит хлорирование азотистых оснований с образованием хлораминов вида $RNHCl$ (для экзоциклического азота) и $RR'NCl$ (для эндоциклического азота) [9]. При этом $RNHCl$ -производные были обнаружены при взаимодействии гипохлорита со всеми нуклеозидами, имеющими в своем составе экзоциклический азот (аденозин, гуанозин и цитидин), тогда как эндоциклические хлорамины

экспериментально наблюдали только после реакций с гуанозином и тимидином [10].

Вместе с тем вопрос о влиянии структурной организации НК на их взаимодействие с гипохлоритом остается существенно менее изученным. На сегодняшний день имеются лишь немногочисленные работы, в которых проводился косвенный анализ влияния гипохлорита на пространственную структуру ДНК методами электрофореза, вискозиметрии, а также по эффективности окрашивания бромистым этидием [9–11].

В настоящей работе методами УФ и ИК спектроскопии проведен анализ влияния структуры НК на протекание реакции с гипохлоритом на примере трех наиболее распространенных и биологически значимых типов НК: двунитевая ДНК в В-форме, одонитевая РНК, а также нуклеотид фосфаты.

Материалы и методы

В работе использовали высокомолекулярную ДНК тельца (Sigma), полиадениловую кислоту (polyA) и аденозин-5'-тетрафосфорную кислоту (АТФР) (Reanal). Концентрацию растворов НК определяли спектрофотометрически, используя для ДНК метод гидролиза в присутствии хлорной кислоты [12], для растворов АТФР и polyA использовали коэффициенты молярной экстинкции ϵ_{258} , равные соответственно 15400 и $9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрация НК кислот во всех комплексах составляла $7.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Использованные в работе растворы гипохлорита натрия ($NaOCl$) были получены в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера методом

электролиза 3%-раствора хлорита натрия током 3 А в течение 30 min. Содержание хлора в исходных растворах составило 801 и 1566 mg/L. Концентрацию гипохлорита натрия в водном растворе определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [13]. Концентрация гипохлорита натрия во всех комплексах составляла $7.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Комплексы НК и гипохлорита натрия готовили в растворах 1 mM NaCl путем прямого смешивания равных объемов растворов соответствующих компонентов в нужных концентрациях. Молярное отношение гипохлорита к азотистым основаниям во всех исследованных комплексах составляло 5 : 1.

УФ спектроскопия

Непосредственно после приготовления все исследуемые растворы помещали в спектрофотометр. Измерения проводили в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Спектры поглощения регистрировали с использованием сканирующего спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Япония). При регистрации временных зависимостей реакцию проводили непосредственно в кювете. Спектры регистрировали на временах от 1 до 3 min с интервалом 0.5 min, от 3 до 10 min с интервалом 1 min, от 10 до 120 min с интервалом 10 min, а также дополнительно через 24 h после начала реакции.

ИК спектроскопия

Для регистрации спектров ИК поглощения комплексы, полученные через 120 min после начала реакции, лиофильно высушивали, после чего перетирали с порошком KBr из расчета 0.5 mg образца на 100 mg KBr и с помощью ручного пресса формировали таблетки. Спектры регистрировали на ИК фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker, Германия), оснащенный низкошумящим детектором MCT (HgCdTe). Оптические пути продували сухим газообразным азотом. Инфракрасные спектры регистрировали в области $4000\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$ с разрешением 2 cm^{-1} , каждый спектр усредняли по 128 накоплениям. Обработку полученных спектров производили с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором.

Результаты и их обсуждение

Согласно имеющимся в настоящее время данным [1] основной мишенью при взаимодействии нуклеиновых кислот с гипохлоритом являются атомы азота в составе азотистых оснований, тогда как влияние пространственной организации НК на эффективность этой реакции остается не вполне ясным. Для анализа влияния структуры НК на их взаимодействие с гипохлоритом в работе были использованы три различные по своей

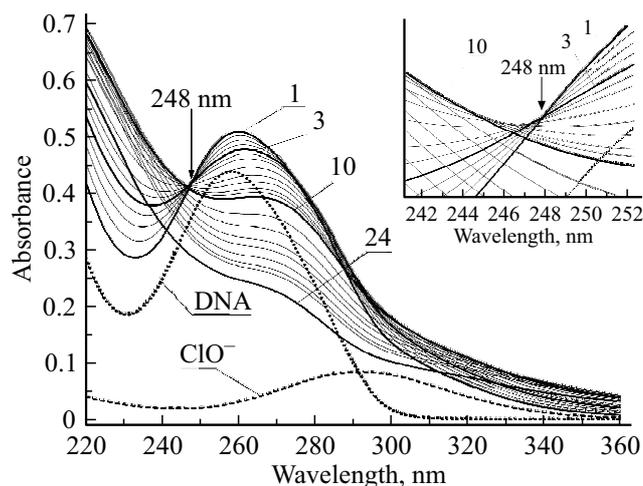


Рис. 1. Спектры УФ поглощения комплексов ДНК с гипохлоритом натрия. Стрелкой на рисунке отмечено положение изобестической точки при 248 nm, данная область представлена более детально на врезке. Спектры, отмеченные выносками, соответствуют 1, 3, 10 min и 24 h после начала реакции. Прерывистыми линиями обозначены спектры ДНК и гипохлорита в концентрациях, соответствующих началу времени реакции.

структурной организации образца: двунитевая ДНК в В-форме (высокомолекулярная ДНК тимуса телят), однонитевая молекула РНК (полиадениловая кислота, polyA), а также нуклеотид фосфаты (аденозинтетрафосфат, АТФР). В работе были проанализированы реакции, протекающие в условиях небольшого избытка гипохлорита по отношению к количеству потенциальных мишеней (атомов азота) в составе НК. Число атомов азота, приходящихся на одно основание, не может превышать пяти (для пуринов), из которых доступны для взаимодействия не более четырех. Таким образом, для создания минимального гарантированного избытка гипохлорита в системе достаточно использовать молярное отношение гипохлорита к азотистым основаниям $R = 5$.

Исследование кинетики реакции гипохлорита с НК

На первом этапе нами был проведен сравнительный анализ кинетики реакций гипохлорита с выбранными образцами НК. Взаимодействие гипохлорита с азотистыми основаниями приводит к изменениям их спектральных характеристик, что позволяет следить за протеканием реакции по спектрам УФ поглощения НК. Для наблюдения за изменениями в спектрах комплексов NaOCl/НК реакцию смесь помещали в спектрофотометр и регистрировали спектры поглощения раствора в различные моменты времени в интервале от 1 min до 24 h после начала реакции.

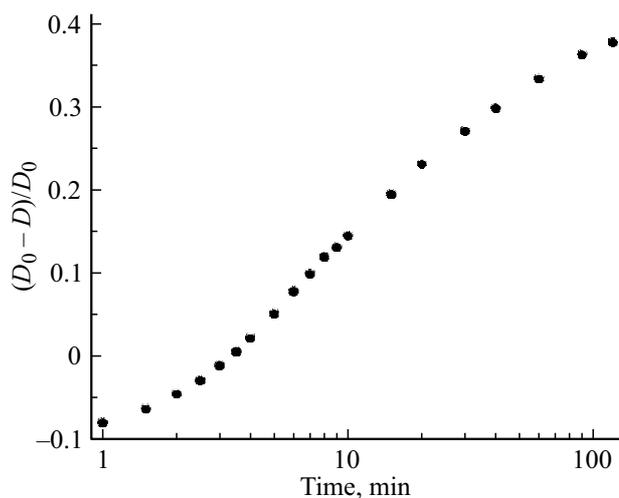


Рис. 2. Зависимость относительного изменения поглощения комплекса ДНК-NaOCl на длине волны 260 nm от времени. За D_0 принята сумма поглощений ДНК и гипохлорита в начальный момент времени.

Кинетика реакции с двуниевой ДНК

Характерные спектры УФ поглощения комплексов ДНК и гипохлорита, а также динамика изменения спектров с течением времени представлены на рис. 1. На этом же рисунке приведены спектры растворов ДНК и NaOCl перед началом реакции. В спектре ДНК наблюдается полоса поглощения с максимумом при 258 nm, спектр гипохлорита характеризуется наличием полосы поглощения с максимумом при 292 nm, что соответствует ионизированной форме ClO⁻ [14]. Первый спектр комплекса ДНК-гипохлорит натрия был получен через 1 min после начала реакции. Для этого спектра наблюдается увеличение поглощения в максимуме полосы на 16% относительно суммы поглощений исходных растворов ДНК и гипохлорита натрия на той же длине волны и bathochromic сдвиг максимума полосы поглощения ДНК на 2 nm. Во всех последующих спектрах комплексов (с 1.5 min до суток) поглощение в этой области спектра монотонно уменьшается. Для спектров, соответствующих интервалу от 1 до 3–3.5 min характерно наличие изобестической точки при 248 nm, что указывает на единственный тип взаимодействия, проявляющийся в спектрах на этом промежутке времени. Спектры, соответствующие первым 10 min реакции, демонстрируют bathochromic сдвиг максимума полосы поглощения ДНК, который к десятой минуте смещается к 266 nm. Дальнейшие превращения в системе сопровождаются уменьшением полосы поглощения ДНК вплоть до ее практически полного исчезновения через 2 h после начала реакции. Параллельно в спектре формируется слабая полоса поглощения в окрестности 325 nm, которая, вероятно, может быть отнесена к неорганическим хлорсодержащим продуктам реакции [15]. В последу-

ющие 22 h в системе не наблюдается существенных изменений спектров поглощения.

Динамику изменения концентрации хромофоров, отвечающих за поглощение ДНК, иллюстрирует зависимость относительного изменения поглощения при 260 nm с течением времени (рис. 2). Более наглядно основные этапы реакции демонстрирует зависимость скорости протекания реакции от времени, которая соответствует графику первой производной концентрации по времени. В нашем случае можно рассмотреть производную зависимости относительного изменения поглощения по времени (рис. 3). На этой зависимости отчетливо наблюдаются три участка, соответствующие протеканию в системе различных реакций в следующих интервалах времени: от начала реакции до третьей минуты после начала реакции, с третьей по девятую минуты, с десятой минуты и далее.

Для того, чтобы получить более детальную информацию об изменениях в составе химических групп ДНК при взаимодействии с гипохлоритом натрия, нами были получены ИК спектры соответствующих систем. На рис. 4 представлены ИК спектры исходного препарата ДНК и ДНК после взаимодействия с гипохлоритом в условиях избытка и недостатка гипохлорита. Основные изменения в спектре ДНК наблюдаются в области 1800–1550 cm⁻¹, соответствующих преимущественно колебаниям карбонильных и аминогрупп в составе азотистых оснований, а также в области 1300–1550 cm⁻¹, где наблюдаются колебания колец в целом, а также колебания связей с участием гетероатомов в кольцах оснований ДНК [16–22]. В ходе реакции с гипохлоритом наблюдается сначала постепенное исчезновение в спектре полос 1653, 1604 и 1578 cm⁻¹, соответствующих колебаниям аминогрупп преимущественно в составе аденина. Исчезновение полос может указывать либо на химическую модификацию аминогрупп, сопровождаю-

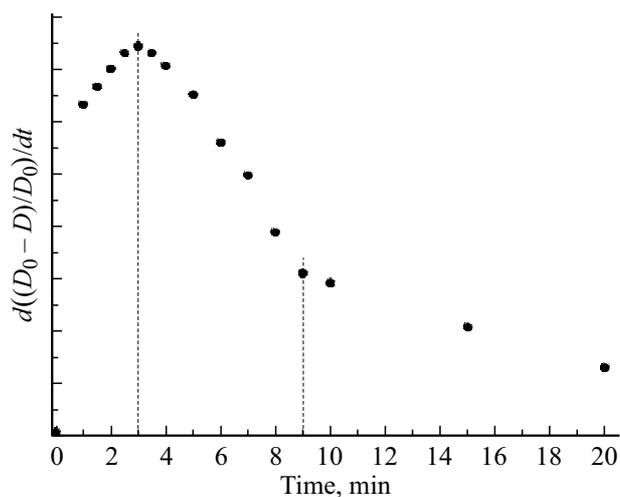


Рис. 3. Зависимость первой производной относительного изменения максимума поглощения комплекса ДНК-NaOCl от времени.

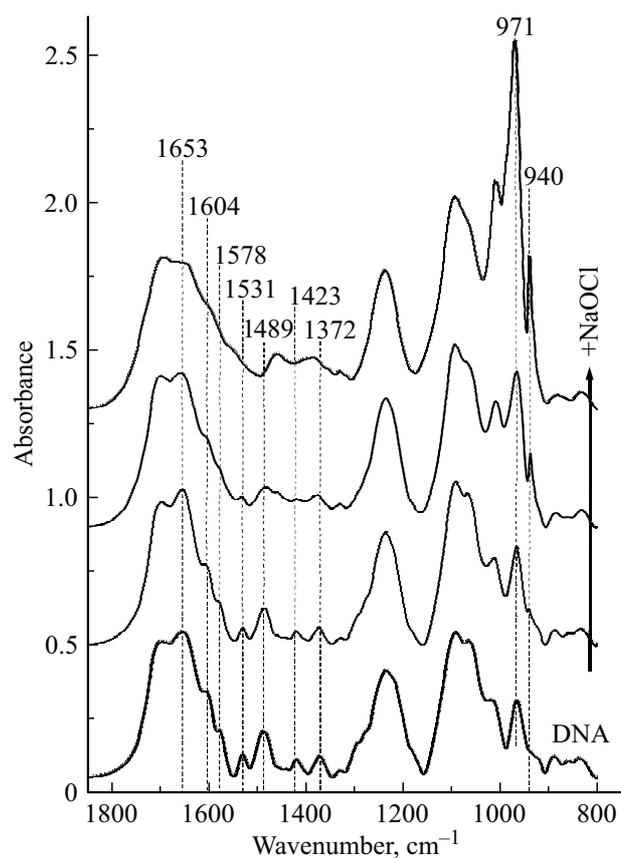


Рис. 4. Спектры ИК поглощения комплексов ДНК с гипохлоритом натрия.

щуюся сдвигом частот колебаний за пределы исследуемого диапазона, либо на их разрушение. Аналогичное поведение, но с некоторой задержкой, демонстрируют полосы 1531, 1489, 1423, 1372 cm^{-1} , соответствующие колебаниям колец и связей C–N в них. Одновременно в спектре начинают появляться полосы 940 и 971 cm^{-1} , относящиеся к валентным колебаниям связей O–Cl и N–Cl производных гипохлорита [23–25].

Таким образом, на основе анализа полученных данных можно заключить, что реакция гипохлорита с основаниями ДНК в условиях эксперимента состоит как минимум из трех стадий. Первая и наиболее быстрая стадия завершается к третьей минуте. При этом, судя по скачкообразному увеличению поглощения и смещению максимума полосы у первого зарегистрированного спектра комплекса (через одну минуту после начала реакции), дальнейшие изменения спектров, наблюдаемые в интервале 1–3 min, соответствуют окончанию первой стадии реакции, которая протекала в первые десятки секунд (рис. 1 и 3). Согласно полученным ранее данным [1,9–11] при взаимодействии ДНК с гипохлоритом наиболее быстрая стадия соответствует образованию нестабильных эндоциклических хлораминов RR, NCl. Хлорирование азотистых оснований способно повлиять на свойства хромофоров, что могло бы объяснить на-

блюдаемый эффект. Вместе с тем хлорирование эндоциклических атомов азота, участвующих в образовании комплементарных пар между азотистыми основаниями, возможно только после разрыва соответствующих водородных связей. Последнее обстоятельство неизбежно приведет как минимум к частичной денатурации ДНК, для которой характерны как гиперхромизм (до 40%), так и батохромный эффект, приводящий к сдвигу максимума полосы поглощения ДНК с 258 на 259 nm [26]. Однако наблюдаемые на первой стадии изменения в спектре соответствуют смещению максимума поглощения до 261 nm и постепенное падение поглощения после первоначального скачка, что не может объясняться исключительно эффектом денатурации. Такое поведение спектров, вероятнее всего, соответствует одновременно протеканию сразу нескольких процессов. В первые секунды доминирует процесс разрыва водородных связей в двойной спирали, который приводит к быстрому возрастанию поглощения и небольшому сдвигу максимума. Далее доминирующей становится реакция с образованием эндоциклических хлораминов, которая сопровождается прежде всего падением поглощения азотистых оснований до уровня, близкого к поглощению ДНК до вступления в реакцию с гипохлоритом. Наблюдающийся небольшой сдвиг максимума поглощения на этой стадии также может быть следствием образования эндоциклических хлораминов. Однако нельзя исключить, что батохромный сдвиг отражает начало следующей стадии реакции, в ходе которой (в интервале 3–9 min) наблюдается сдвиг еще на 5 nm. На второй стадии реакции ДНК с гипохлоритом осуществляется перенос хлора на экзоциклические атомы азота с образованием более устойчивых производных вида RNHCl [1,9–11]. Данная реакция в основном завершается к десятой минуте (рис. 3), когда начинается третья стадия реакции. На завершающей стадии происходит постепенная деградация RNHCl прежде всего за счет взаимодействия с соседними азотистыми основаниями, сопровождающаяся также разрушением последних. На этом этапе в спектрах более не наблюдается батохромного сдвига, а уменьшение количества азотистых оснований сопровождается постепенным исчезновением полосы поглощения ДНК в спектре.

Таким образом, можно предположить, что важным фактором, влияющим на протекание второй и третьей стадий реакции в ДНК, является наличие в ближайшем окружении эндоциклических хлораминов соседних азотистых оснований. Доступность для реакции подобных „близких соседей“ обеспечивается прежде всего полимерной природой ДНК.

Кинетика реакции с АТФР

Иные условия для реакции можно создать в растворе мономеров в отсутствие полимерной фракции. В данной работе исследовали реакцию гипохлорита с аденозинтетрафосфатом (АТФР). С этой целью были получе-

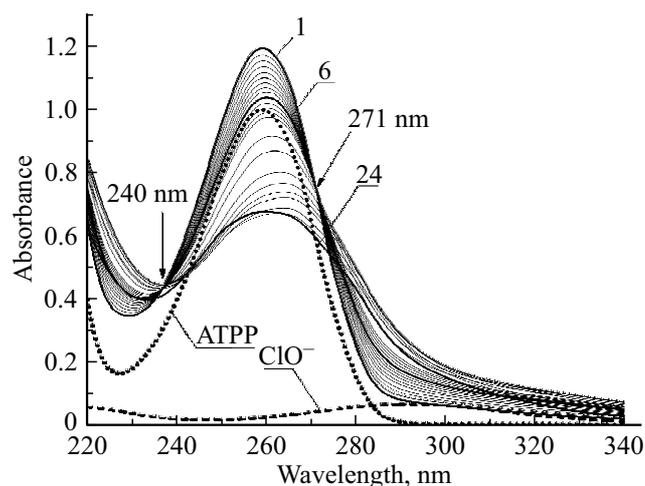


Рис. 5. Спектры УФ поглощения комплексов АТФР с гипохлоритом натрия. Стрелками на рисунке отмечено положение изобестических точек при 240 и 271 nm. Спектры, отмеченные выносками, соответствуют 1, 6 min и 24 h после начала реакции. Прерывистыми линиями обозначены спектры АТФР и гипохлорита в концентрациях, соответствующих началу времени реакции.

ны спектры УФ поглощения комплексов АТФР/СlO⁻ в интервале времени от 1 min до 24 h после начала реакции (рис. 5). В спектре свободного АТФР наблюдается единственная полоса поглощения с максимумом при 259 nm. Первый спектр комплекса АТФР/СlO⁻ был получен через 1 min после начала реакции. Для этого спектра наблюдается увеличение поглощения в максимуме полосы на 20% относительно суммы поглощения исходных растворов АТФР и гипохлорита натрия на той же длине волны. В отличие от рассмотренной выше реакции с ДНК для комплекса АТФР/СlO⁻ bathochromный сдвиг максимума полосы поглощения составляет порядка 0.5 nm. В последующих спектрах комплексов (от 1.5 до 120 min) поглощение в этой области спектра монотонно уменьшается приблизительно до уровня поглощения АТФР перед началом реакции. Для спектров, соответствующих интервалу от 1 до 6 min, характерно наличие двух изобестических точек при 240 и 271 nm. Спектры, соответствующие первым шести минутам реакции, демонстрируют небольшой bathochromный сдвиг максимума полосы поглощения АТФР, который к шестой минуте смещается к 260 nm. Дальнейшие превращения в системе сопровождаются уменьшением полосы поглощения АТФР и продолжающимся bathochromным сдвигом, который заканчивается через 50 min после начала реакции на 264 nm. Интересно отметить, что через два часа после начала реакции в спектре наблюдается отчетливая полоса поглощения АТФР, которая сохраняется и спустя сутки. Более того, через 24 h максимум этой полосы возвращается к ~ 260 nm. Также в отличие от ДНК в спектрах АТФР/СlO⁻ отсутствует полоса в окрестности

325 nm, отнесенная нами к неорганическим хлорсодержащим продуктам реакции.

Более наглядно основные этапы реакции демонстрирует зависимость скорости протекания реакции от времени (рис. 6). На нем отчетливо наблюдаются лишь два участка, соответствующие протеканию в системе различных реакций в следующих интервалах времени: со второй минуты по шестую и с седьмой минуты и далее.

Опираясь на приведенные зависимости, можно сделать вывод, что для реакции гипохлорита с АТФР в условиях эксперимента удалось достоверно наблюдать две стадии. По всей видимости, первая наиболее быстрая стадия образования эндоциклических хлораминов в случае мономерного АТФР завершается через 1.5–2 min и в условиях данного эксперимента достоверно не наблюдается. Возможно, это следствие того, что в данной системе азотистые основания не образуют водородные связи, и атомы азота N1 и N6 доступны для гипохлорита, что облегчает протекание начальных этапов взаимодействия. Тогда, интерпретируя зависимость скорости реакции от времени (рис. 6) по аналогии с подробно описанным выше комплексом ДНК/СlO⁻, можно сказать, что наблюдающаяся в интервале 1.5–6 min реакция соответствует второй стадии, на которой образуются хлорамины вида RNHCl. Далее происходит медленная деградация внешних хлораминов, однако в данном случае она не приводит к полному разрушению азотистых оснований в растворе ввиду отсутствия прямых контактов между ними. По всей видимости, это обстоятельство позволяет части азотистых оснований сохранить свою структуру, что объясняет наличие в спектре соответствующей полосы поглощения даже спустя сутки. Вместе с тем за это время завершается деградация внешних хлораминов RNHCl, что приводит к гипсохромному сдвигу максимума полосы поглощения и ее возврат к позиции 260 nm,

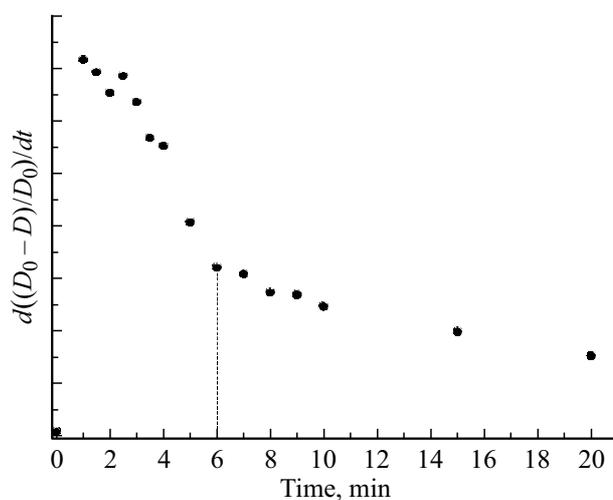


Рис. 6. Зависимость первой производной относительного изменения максимума поглощения комплекса АТФР-NaOCl от времени.

соответствующей состоянию системы до начала переноса хлора на экзоциклический азот.

Таким образом, можно заключить, что отсутствие структуры комплементарных пар оснований обеспечило доступность атомов азота в первом и шестом положениях для реакции с гипохлоритом и заметно ускорило протекание первой стадии реакции. Вместе с тем отсутствие полимерной организации у АТФР привело к сохранению структуры гетероциклов у значительной части азотистых оснований.

Кинетика реакции с одонитовой РНК

Полиадениловая кислота представляет собой одноцепочечный полинуклеотид, в котором азотистые основания не формируют между собой водородные связи, но при этом находятся на общем сахарофосфатном остове. Для изучения реакции гипохлорита с одонитовыми НК мы проанализировали спектры УФ поглощения комплексов polyA/CIO⁻ (рис. 7). Спектр полиадениловой кислоты содержит в исследуемой области одну полосу поглощения с максимумом при 255 nm.

Первый спектр комплекса PolyA/CIO⁻ был получен также через 1 min после начала реакции. В отличие от ранее описанных в работе систем спектр данного комплекса через минуту после начала реакции демонстрирует все признаки завершения второй стадии взаимодействия с гипохлоритом. Поглощение этого комплекса оказалось меньше исходного поглощения свободной НК. Положение максимума поглощения в спектре смещено на 3 nm в длинноволновую область к 258 nm. В последующих спектрах комплексов (от 1.5 от 120 min) поглощение в этой области спектра быстро уменьшается, что сопровождается батохромным сдвигом максимума до 266 nm уже к шестой минуте после начала реакции.

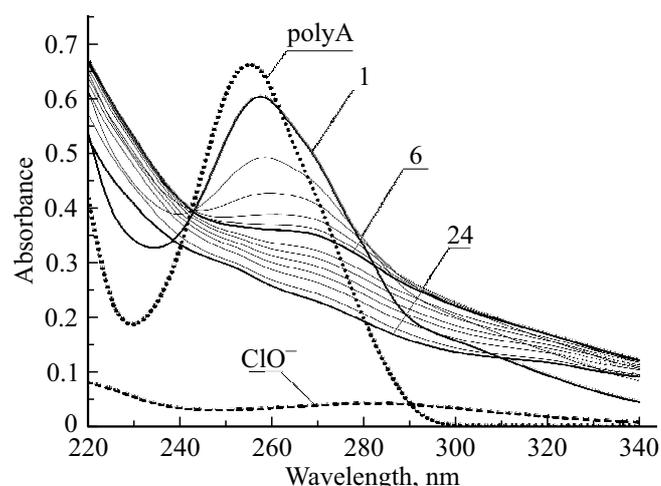


Рис. 7. Спектры УФ поглощения комплексов polyA с гипохлоритом натрия. Спектры, отмеченные выносками, соответствуют 1, 6 min и 24 h после начала реакции. Прерывистыми линиями обозначены спектры polyA и гипохлорита в концентрациях, соответствующих началу времени реакции.

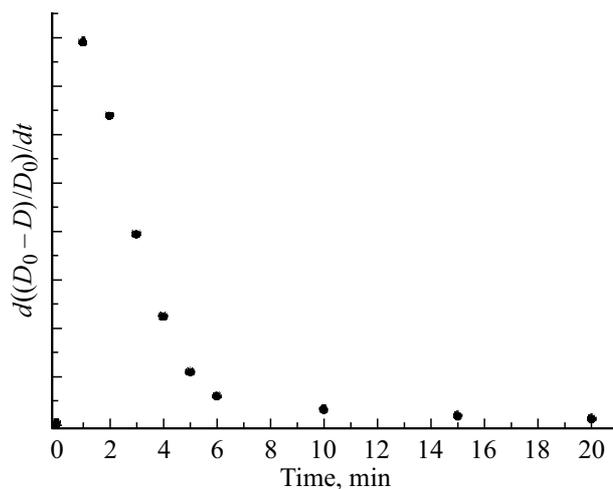


Рис. 8. Зависимость первой производной относительного изменения максимума поглощения комплекса polyA-NaOCl от времени.

К этому времени полностью изменяется форма спектра, что указывает на начавшееся разрушение гетероциклов азотистых оснований. Дальнейшие превращения в системе приводят практически к полному исчезновению в спектре полосы поглощения аденина уже через 20–30 min после начала реакции. Также, начиная приблизительно с десятой минуты, в спектрах PolyA/CIO⁻ начинает формироваться полоса в окрестности 325 nm. Зависимость скорости протекания реакции от времени (рис. 8) демонстрирует два участка, соответствующих протеканию в системе различных реакций при временах до и после 6 min.

Опираясь на приведенные зависимости, можно сделать вывод, что для реакции гипохлорита с полиадениловой кислотой в условиях эксперимента удалось наблюдать завершающий участок формирования экзоциклических хлораминов и их последующую деградацию, сопровождающуюся быстрым и полным разрушением структуры гетероциклических колец азотистых оснований. Такой характер реакции полностью подтверждает высказанное выше предположение о влиянии структуры полинуклеотидов на протекание реакции с гипохлоритом. Более того, отсутствие структуры комплементарных пар при наличии полимерной организации оснований значительно ускорило не только стадию первоначального хлорирования гетероциклов, но и повысило эффективность протекания последующих стадий реакции. Это обстоятельство, вероятно, указывает на возможность реакции между хлорированными гетероциклами не позднее второй стадии реакции. Не исключено также, что на возросшую эффективность разрушения гетероциклов повлияло формирование на первых этапах иных продуктов реакции, помимо непосредственно хлораминов.

Таким образом, можно заключить, что структурная организация НК существенно влияет на их взаимодействие с гипохлоритом. Наличие стабилизированных

водородными связями комплементарных пар оснований, по всей видимости, является лимитирующим фактором начала реакции гипохлорита с эндоциклическими атомами азота. Вместе с тем, полимерная структура НК существенно ускоряет и повышает эффективность последующих стадий реакции, связанных с хлорированием экзоциклических атомов азота и разрушением кольцевой структуры азотистых оснований.

Благодарности

Авторы выражают благодарность доктору биологических наук Афиногеновой Анне Геннадьевне за любезно предоставленные растворы гипохлорита. Часть работ была выполнена с использованием оборудования Научного парка СПбГУ (Оптические и лазерные методы исследования вещества; Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанозлектроники; Криогенный отдел).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] C.M.C. Andrés, J.M. Pérezdela Lastra, C.A. Juan, F.J. Plou, E.Pérez-Lebeña. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (18), 10735 (2022). DOI:10.3390/ijms231810735
- [2] N. Kishimoto. *J. Water and Envir.Techol.*, **17** (5), 302 (2019). DOI: 10.2965/jwet.19-021
- [3] W.H. Dennis Jr., V.P. Olivieri, C.W. Kruse. *Water Res.*, **13** (4), 357 (1979). DOI:10.1016/0043-1354(79)90023-X
- [4] M.S. Block, B.G. Rowan. *J. Oral Max. Surg.*, **78** (9), 1461 (2020). DOI: 10.1016/j.joms.2020.06.029
- [5] M. GessaSorroche, I. Relimpio López, S. García-Delpech, J.M. Benítezdel Castillo. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, **97** (2), 77 (2022). DOI: 10.1016/j.oftale.2021.01.010
- [6] J.C. Morris. *Phys. Chem.*, **70** (12), 3798 (1966). DOI: 10.1021/j100884a007
- [7] H. Ohshima, M. Tatemichi, T. Sawa. *Arch. Biochem. Biophys.*, **3** (11), 417(2003). DOI: 10.1016/s0003-9861(03)00283-2
- [8] C. Bernofsky. *The FASEB J.*, **5** (3), 295 (1991). DOI: 10.1096/fasebj.5.3.1848195
- [9] C.L. Hawkins, M.J. Davies. *Chem. Res. Toxicol.*, **15** (1), 83 (2002). DOI: 10.1021/tx015548d
- [10] C.L. Hawkins, M.J. Davies. *Chem. Res. Toxicol.*, **14** (8), 1071 (2001). DOI: 10.1021/tx010071r
- [11] W.A. Prutz. *Arch. Biochem. Biophys.*, **332** (1), 110 (1996). DOI: 10.1006/abbi.1996.0322
- [12] А.С. Спирин. *Биохимия*, **23** (5), 656 (1958).
- [13] I.Q. Tantrya, S. Waris, S. Habiba, R.H. Khanb, R. Mahmood, A.A.I. *Int. J. Biol. Macromol.*, **106**, 551(2018). DOI: 10.1016/j.jbiomac.2017.08.051
- [14] S. Nakagawara, T. Goto, M. Nara, Y. Ozawa, K. Hotta, Y. Arata. *Anal. Sci.*, **14** (4), 691 (1998). DOI: 10.2116/analsci.14.691
- [15] R. Sant'Anna, C. Santos, G. Silva, R. Ferreira, A. Oliveira, C. Côrtes, R. Faria. *J. Braz. Chem. Soc.*, **23** (8), 1543 (2012). DOI: 10.1590/S0103-50532012005000017
- [16] M. Tsuboi. *Appl. Spectr. Rev.*, **3** (1), 45 (1970). DOI: 10.1080/05704927008081687
- [17] A.M. Polyanichko, V.V. Andrushchenko, P. Bouř, H. Wieser. *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy* (Nova Scien. Pub., 2011). P. 67–126.
- [18] A.M. Polyanichko, H. Wieser. *Biopolymers*, **78** (6), 329 (2005). DOI: 10.1002/bip.20299
- [19] E. Taillandier, J. Liquier. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, ed. by J.M. Chalmers, P.R. Griffiths (John Wiley & Sons Ltd., 2002). P. 3465–3480. DOI 10.1002/0470027320.s8204
- [20] B.R. Wood. *Chem. Soc. Rev.*, **45** (7), 1980 (2016). DOI: 10.1039/C5CS00511F
- [21] M.L.S. Mello, B.C. Vidal. *Plos One*, **7** (8), e43169 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0043169
- [22] E. Taillandier. *J. Liquier. Meth. Enzym.*, **211**, 307 (1992).
- [23] F. Su, J.G. Calvert, C.R. Lindley, W.M. Uselman, J.H. Shaw. *J. Phys. Chem.*, **83** (8), 912 (1979). DOI: 10.1021/j100471a006
- [24] R. Servaty, J. Schiller, H. Binder, B. Kohlstrunk, K. Arnold. *Bioorg. Chem.*, **26** (1), 33 (1998). DOI: 10.1006/bioo.1998.1085
- [25] J. Vander Auwera, J. Kleffmann, J.M. Flaud, G. Pawelke, H. Bürger, D. Hurtmans, R. Pétrisse. *J. Mol. Spectrosc.*, **204** (1), 36 (2000). DOI: 10.1006/jmsp.2000.8197
- [26] M. Falk. *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (6), 1226 (1964). DOI: 10.1021/ja01060a054