

PACS: 71.36.+c

Е.А. Гребнева

ПОЛУЭМПИРИЧЕСКАЯ ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ТОЛПЫГО И ГРЕБНЕВОЙ И ЕЕ ВКЛАД В ОБОСНОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНО-ТАУТОМЕРНЫХ МОДЕЛЕЙ

Донецкий физико-технический институт им. А.А. Галкина

Статья поступила в редакцию 11 ноября 2019 года

Разработана полуэмпирическая потенциальная функция Толпыго и Гребневой для протонов водородных (H) связей, справедливая для различных длин H-связей. Разработан метод, позволяющий аналитически и с высокой точностью находить основное и несколько возбужденных состояний протона. Найдены волновые функции протона при различных длинах H-связи. Построены потенциальные кривые для широкого спектра длин H-связей в димере воды. Использование этих кривых позволило разработать механизм образования редких таутомерных форм спаренных оснований ДНК. Полученные результаты послужили квантово-механическим фундаментом для обоснования полимеразно-таутомерных моделей ультрафиолетового мутагенеза, радиационно-индуцированных байстендер эффектов и радиационно-индуцированной нестабильности генома. Экспериментальные данные подтверждают полимеразно-таутомерные модели.

Ключевые слова: водородные связи, полуэмпирическая потенциальная функция для водородных связей, редкие таутомерные формы оснований ДНК, ультрафиолетовый мутагенез, радиационно-индуцированные байстендер эффекты, радиационно-индуцированная нестабильность генома

Введение

Общепринятая в настоящее время полимеразная парадигма мутагенеза опирается на гипотезу о том, что причиной мутаций являются случайные ошибки ферментов ДНК-полимераз, которые встраивают напротив матричных оснований ДНК, находящихся в канонических таутомерных формах, случайные канонические основания, не образующие с матричными основаниями ДНК H-связей [1]. Однако эта парадигма противоречит экспериментальным данным и не способна объяснить ни одного явления мутагенеза [2]. Поэтому мною предложены и разрабатываются полимеразно-таутомерные модели мишенного ультрафиолетового мутагенеза, радиационно-индуцированных байстендер эффектов и радиационно-индуцированной нестабильности генома [2–10]. Полимеразно-таутомерные модели опираются на идею Уотсона и Крика о том, что причиной мутагенеза может быть способность оснований ДНК, связанных между собой H-связями, находиться в различных таутомерных формах [11].

Огромная роль Н-связей обусловлена тем, что их свойствами определяются: биологическая активность нуклеиновых кислот [2–10], образование радиационно-индуцированных байстендер эффектов [2,3,7], радиационно-индуцированной нестабильности генома [2,3,8,9] и, следовательно, риска возникновения раковых заболеваний. Различные таутомерные состояния одной и той же молекулы различаются только тем, что к этой молекуле присоединились либо из нее были удалены один или несколько атомов водорода, участвующих в образовании Н-связей между основаниями ДНК.

Для того чтобы понять, как образуются различные мутации, необходимо знать, как под действием различных мутагенов изменяются таутомерные состояния оснований ДНК и при каких условиях такие редкие таутомерные состояния будут стабильными. Решение этой задачи требует изучения свойств средних по величине Н-связей, характерных для ДНК, в основном и возбужденных состояниях и при различных длинах данных связей.

Водородной называется такая связь, в которой особое участие принимает атом водорода, уже связанный с другим атомом. Эту связь принято обозначать пунктиром: $RA\text{--}H\text{...}BR_1$ (тут предполагается, что с атомом A водород образует прочную химическую связь). Первым этапом решения любой задачи об Н-связи является нахождение волновой функции электронов и ее энергии, т.е. $V(r, R)$. Лучше всего было бы воспользоваться результатами расчетов *ab initio* на широком базисе. Однако в настоящее время такие расчеты имеются для сравнительно немногих простейших веществ и только для равновесных длин связей. А нам необходимо знание $V(r, R)$ для произвольных длин Н-связей и сложных веществ. Получить нужные потенциалы можно с помощью полуэмпирических потенциальных функций [10,12].

1. Полуэмпирическая потенциальная функция Толпыго и Гребневой для водородных связей

К сожалению, полуэмпирические потенциальные функции, описывающие потенциальные кривые Н-связей, крайне ненадежны из-за неточности на больших расстояниях от минимума [10]. Поэтому мы с К.Б. Толпыго разработали новую полуэмпирическую потенциальную функцию, хорошо работающую для длин Н-связей, отличных от равновесных [10,12–14].

Нами была предложена универсальная форма модельного потенциала для линейной связи $A\text{--}H\text{...}B$ в виде суммы четырех членов: 1) потенциала связи $A\text{--}H$ в форме потенциала Морса; 2) потенциала электростатического взаимодействия атомов A , H , B и их окружения, рассчитанного по значениям средних зарядов атомов; 3) потенциала отталкивания оболочек атомов A , B вида $V_{\text{rep}}(R) = A \exp\{-a(R - R_0)\}$; 4) добавочного потенциала $V_B(R - r)$, описывающего взаимную поляризацию атомов и эффект перераспределения электронной плотности с изменением расстояния $R - r$, также описываемого потенциалом Морса, но с другими параметрами. Параметры потенциала $V_B(R - r)$ определялись для Н-связи в димере воды из условия наилучшего согласия рассчитанной нами зависимости энергии связи от ее длины R [10,12], полученной в расчетах *ab initio* [15].

2. Определение параметров модельного потенциала для протона водородной связи для димера воды

Протонный потенциал $V(r, R)$, определяющий свойства Н-связи $R_1A-H...BR_2$, зависит как от природы электроотрицательных атомов A, B , так и от свойств тех молекул R_1A и BR_2 , которым принадлежат эти атомы. При больших расстояниях R (т.е. существенно превосходящих равновесие R_0) этот потенциал может быть получен как кулоновский потенциал некоторого диполя, замещающего молекулу BR_2 и действующего на все заряды молекулы R_1A . Напротив, при $R < R_0$ добавочный (короткодействующий) потенциал может быть представлен в виде суммы членов $V_B(R - r)$ (зависит от $R - r$) и отталкивания $A \exp\{-a(R - R_0)\}$ (зависит от R). Численные расчеты, проведенные для димера воды, показывают, как можно разумно определить форму $V(r, R)$ в согласии с имеющимися данными об Н-связи [10,12–14]. Пользуясь зависимостью энергии связи в системе $(H_2O)_2$, рассчитанной из первых принципов в [15], мы имеем достаточно данных для определения всех параметров теории. Для контроля точности в [10,12] зависимость $E(R)$, полученную с помощью нашего модельного потенциала, сравнивали с данными [15].

На полученные параметры протонного потенциала некоторое влияние оказывает то обстоятельство, что колебание связи $A-H$ в действительности является не изолированным, а принадлежащим нескольким собственным колебаниям молекулы R_1A-H и конечной нулевой энергии колебания протона.

3. Модельный потенциал $\tilde{V}(r, R)$. Уровни энергии протона

Основное и несколько возбужденных состояний протона могут быть найдены аналитически и с высокой точностью путем аппроксимации протонного потенциала $V(r, R)$ вблизи его минимума некоторым потенциалом Морса $\tilde{V}(r, R)$, параметры которого зависят от R [10,12].

Найдены волновые функции протона $\Psi_N(r)$ при различных длинах Н-связи. Оказалось, что протонные уровни E_0, E_1, E_2 , представляющие собой адиабатические потенциалы для взаимодействия атомов A, B при различных R , имеют сходную форму, причем их эффективный радиус действия несколько увеличивается с ростом номера возбуждения n [10,12].

Было учтено влияние ангармонизма, нулевой энергии протона и совместно характера колебаний атомов в молекуле H_2O на форму $V(r, R)$ [10,12].

4. Влияние диэлектрической среды на потенциалы и свойства водородной связи

Расчитанные значения потенциала Н-связи $V(r, R)$ относятся, строго говоря, только к молекулам в вакууме [12–14]. Поэтому в [16] мы оценили влияние среды на форму потенциала $V(r, R)$. Описывая «среду» (водную) макроскопически, с помощью высокочастотной диэлектрической проницаемости

$\varepsilon_{\infty} = 1.777$, можно приближенно вычислить изменение энергии системы $R_1A-H...BR_2$, обусловленное поляризацией окружения зарядами нашей системы. Поляризационную энергию рассматривали в духе первых работ Мотта–Литлттона [17] и поляризационной теории Пекара [18].

5. Свойства возбужденных водородных связей в системе спаренных оснований гуанин–цитозин

Полуэмпирическая потенциальная функция Толпыго и Гребневой была использована для нахождения потенциальных функций для протонов всех трех Н-связей в спаренных основаниях гуанин–цитозин. Это позволило нам с К.Б. Толпыго изучить различные свойства возбужденных Н-связей в ДНК [10,19].

5.1. Потенциалы протонов водородных связей в системе спаренных оснований гуанин–цитозин

Мы с К.Б. Толпыго получили модельные потенциалы для протонов трех Н-связей между основаниями ДНК гуанин–цитозин [1,19,21], используя методику, предложенную для димера воды [10,12]. Параметры потенциала $V_B(R-r)$ определяли для Н-связи в системе гуанин–цитозин из условия наилучшего согласия $V(r, R_0)$ с расчетами *ab initio* [10,19,21]. Были найдены параметры потенциалов Н-связей в системе спаренных оснований гуанин–цитозин в зависимости от длин связей, в частности, при небольших колебаниях расстояния между центрами масс гуанина и цитозина, а также при определенных деформациях отдельных боковых групп оснований [10,19,21].

5.2. Частоты и амплитуды атомных колебаний в системе спаренных оснований гуанин–цитозин цепочки ДНК

Мы с К.Б. Толпыго рассмотрели изолированную пару оснований G–C, связанных тремя Н-связями. Мы изучили колебания боковых групп (O, NH₂), участвующих в связи $h-b-1$, и колебания центров масс оснований в случае, когда все связи не возбуждены, а также когда связь $h-b-1$ возбуждена на первый уровень. Вследствие зависимости Н-связи от ее длины (т.е. расстояния $R_1 = ON$) и расстояния между центрами масс оснований колебания боковых групп и центров масс оснований частично смешиваются. Возникает высокочастичное колебание, в котором участвуют преимущественно смещения боковых групп, и низкочастотное, где изменяется главным образом расстояние между центрами масс. Возбуждение связи $h-b-1$ приводит к сдвигу частот: высокочастотная возрастает, а низкочастотная уменьшается [10,20,21]. Та же задача решается для системы поли (dG)–поли (dC), где учитывается взаимодействие соседних пар оснований [10,22].

5.3. Безызлучательное девозбуждение протонов водородных связей в молекуле ДНК

Безызлучательными переходами называют передачу энергии возбуждения легкой подсистемы степеням свободы тяжелой подсистемы, не сопро-

вождающуюся излучением фотонов. Обычно в качестве легкой подсистемы рассматриваются электроны атомов, а тяжелой – их ядра, изучается переход энергии возбуждения электронов к колебаниям ядер. Вероятность безызлучательной релаксации может быть большой, и именно она в значительной степени определяет кинетические константы электронных процессов в кристаллах, полупроводниках, макро- и биологических молекулах.

Мы с К.Б. Толпыго разработали теорию безызлучательных переходов для протонов Н-связи в спаренных основаниях ДНК. Такие переходы были обусловлены отклонением системы от адиабатичности с параметром малости $x = (m_H / m_{N_1O})^{1/4} \approx 1/2$ (m_H – масса протона, m_{N_1O} – масса азота или кислорода). Мы оценили время жизни возбужденного состояния для атома водорода Н-связи для тепловой релаксации энергии возбуждения в основаниях гуанин–цитозин, связанных Н-связями [10,23,24].

6. Механизм образования редких таутомерных форм оснований ДНК

Многю разработан механизм образования редких таутомерных форм оснований ДНК, появляющихся при облучении двухцепочечной ДНК ультрафиолетовым светом [25–27]. Были рассмотрены процессы, происходящие в молекуле ДНК при поглощении ультрафиолетового кванта энергии одним из оснований. Показано, что таутомерные изменения могут происходить при безызлучательном девозбуждении с триплетных уровней оснований молекулы ДНК, поглотившей ультрафиолетовый квант энергии. Потеря или присоединение атомов водорода, участвующих в образовании Н-связей между основаниями ДНК, происходит вследствие сильных вынужденных колебаний. Такие колебания приводят к изменению длин Н-связей.

Как показано на рисунке, при уменьшении длины Н-связи протонный потенциал превращается в одноямный, а при увеличении длины Н-связи появ-

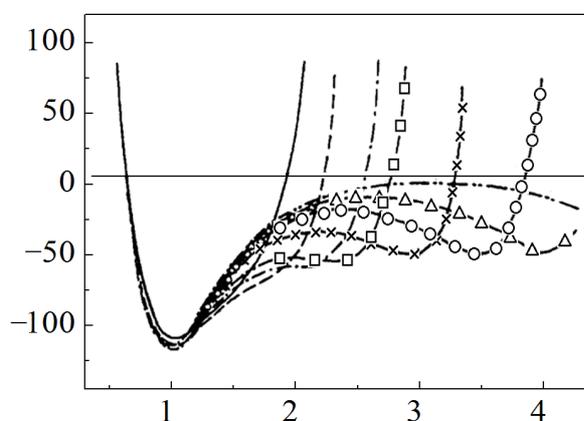


Рис. Протонные потенциалы для различных длин Н-связей R (в Å), полученные при учете ангармонизма и квантового характера движения протона: \cdots – $R_0 = 2.962$, $—$ – $R_1 = 2.38$, $- - -$ – $R_2 = 2.962$, \square – \square – \square – $R_3 = 3.174$, \times – \times – \times – $R_4 = 3.696$, \circ – \circ – \circ – $R_5 = 4.232$, \triangle – \triangle – \triangle – $R_6 = 4.76$, $- \cdot - \cdot -$ – $R_7 = 5.819$ [14]

ляется второй минимум, который становится все глубже с ростом длины Н-связи. Следовательно, при сильных колебаниях длины Н-связи атом водорода может оказаться во второй потенциальной яме. Если же водородные связи разорвутся или даже сильно удлинятся, то атом водорода не сможет вернуться в прежнее положение. Это и означает, что образовались редкие таутомерные формы данных молекул.

Одним из этапов образования мутаций является этап полураскрытых метастабильных состояний [28,29]. Найдено 7 редких таутомерных форм для уотсон-криковских пар гуанина и цитозина [5] и 5 – для канонических пар тимина и аденина [28,29], способных влиять на характер спаривания оснований. Изучены условия, при которых данные редкие таутомерные формы оснований ДНК будут устойчивыми [5], а именно, если соответствующие основания входят в состав циклобутановых пиримидиновых димеров [5,28,29] (приводят к так называемому мишенному мутагенезу [4–6]) или находятся в небольших (3–5 оснований) окрестностях от них [7] (вызывают так называемый немиченный мутагенез [6,7]). Эти таутомерные формы сохраняются и при синтезе ДНК [5].

7. Смена парадигмы в мутагенезе

Разработка механизма образования редких таутомерных форм оснований ДНК позволила мне предложить полимеразно-таутомерные модели мишенного ультрафиолетового мутагенеза [4–6], радиационно-индуцированных байстендер эффектов [7,10] и радиационно-индуцированной нестабильности генома [8–10]. Эти модели опираются на развитие идеи, предложенной лауреатами Нобелевской премии Уотсоном и Криком. Они в 1953 г. предположили, что причиной мутагенеза может быть способность оснований ДНК находиться в различных таутомерных формах [11]. Эти формы одной и той же молекулы различаются только тем, что к данной молекуле присоединились либо из нее были удалены один или несколько атомов водорода. Конфигурация атомов водорода, участвующих в образовании Н-связей между основаниями ДНК, может быть причиной встраивания ошибочного основания, что может привести к замене одного основания на другое, иными словами, к замене одной буквы на другую в тексте ДНК. Это и будет означать образование мутации.

Многочисленны механизмы всех существующих типов мутаций: мишенных (образующихся на участках ДНК, останавливающих синтез ДНК) [2–6,10] и немиченных (появляющихся на так называемых неповрежденных участках ДНК) [2,3,7,10], которые образуются сразу после облучения ДНК, а также мишенных задерживающихся [2,3,8–10] и немиченных задерживающихся [36], которые образуются через продолжительное время после облучения. Кроме того, мною предложены механизмы: замены буквы на другую букву (мишенных мутаций замены оснований) [2–6]; вставок (мишенных инсерций) [2,3,6,30]; потери одного или нескольких оснований (мишенных

делений) [2,3,6,31]; замены участка текста на другой текст иной длины (мишленных сложных мутаций) [2,3,6,32].

Поскольку общепринятая полимеразная парадигма не может объяснить ни одного явления мутагенеза, а предложенная мною полимеразно-таутомерная парадигма может объяснить любое явление мутагенеза, то это и означает смену парадигмы в мутагенезе.

Имеются прямые экспериментальные доказательства идеи Уотсона и Крика [11] и полимеразно-таутомерных моделей мутагенеза. Как известно, редкие таутомерные формы оснований ДНК были найдены в молекуле ДНК [33]. Пары оснований ДНК, одно из которых находится в редких таутомерных формах, были найдены в активных центрах ДНК-полимераз [34,35], что является прямым экспериментальным подтверждением полимеразно-таутомерных моделей [2–10].

Для обоснования механизма образования редких таутомерных форм оснований ДНК и изучения свойств возбужденных Н-связей в спаренных основаниях ДНК мы с К.Б. Толпыго выполнили несколько циклов квантово-механических расчетов [10,12–14,16,19–24].

Заключение

Найдены волновые функции, уровни энергии и потенциальные кривые для протонов Н-связей в димере воды. Расчеты выполнены для широкого спектра длин Н-связей. Использована полуэмпирическая потенциальная функция Толпыго и Гребневой [10,12–14]. Параметры потенциальной функции определены для Н-связи в димере воды из условия наилучшего согласия зависимости энергии связи от ее длины в расчетах *ab initio* и от других параметров. Разработан метод, позволяющий аналитически и с высокой точностью находить основное и несколько возбужденных состояний протона.

Использование полученных потенциальных кривых для различных длин Н-связей позволило разработать механизм образования редких таутомерных форм спаренных оснований ДНК [4–6]. В свою очередь, это дало возможность разработать полимеразно-таутомерные модели мишенного [2–6,10], немшенного [2,3,7,10] и задерживающегося ультрафиолетового мутагенеза [2,3,8–10], что привело к смене парадигмы в мутагенезе [2]. Экспериментальные данные [21,22] подтверждают полимеразно-таутомерные модели [2–9,23–25]. В работе [36] мною показана ошибочность вывода, сделанного из модели риска заболевания раком [37], о том, что образование около 67% всех мутаций не вызвано воздействием каких-либо мутагенов, а является результатом обычной репликации. Следовательно, и выводы о том, что никакие меры профилактики не могут предотвратить раковые заболевания, тоже ошибочны.

Общепринятая полимеразная парадигма противоречит ряду экспериментальных данных и не может объяснить большинство явлений мутагенеза. Только замена полимеразной парадигмы на полимеразно-таутомерную способна разрешить большинство проблем мутагенеза, объяснить мишенный му-

тагенез, радиационно-индуцированные байстендер эффекты и радиационно-индуцированную нестабильность генома. Результаты квантово-механических расчетов Толпыго и Гребневой [1,11–15] являются квантово-механическим базисом полимеразно-таутомерных моделей [1–9]. Эксперименты [16–18] подтверждают справедливость полимеразно-таутомерных моделей ультрафиолетового мутагенеза, радиационно-индуцированных байстендер эффектов и радиационно-индуцированной нестабильности генома [1–9].

1. *J.-S. Taylor*, *Mutat. Res.* **510**, 55 (2002).
2. *H.A. Grebneva*, *Int. J. Mol. Biol.: Open Access* **4**, 1 (2019).
3. *E.A. Grebneva*, *ФТВД* **28**, № 3, 98 (2018).
4. *H.A. Grebneva*, *Environ. Mol. Mutagen.* **47**, 733 (2006).
5. *H.A. Grebneva*, *Int. J. Mol. Biol.: Open Access* **1**, 4 (2016).
6. *H.A. Grebneva*, *Polymerase-tautomeric model for ultraviolet mutagenesis: Targeted base substitution and frameshift mutations caused by cis-syn cyclobutane thymine dimmers*, LAP LAMBERT Academic Publishing, Germany (2017).
7. *H.A. Grebneva*, *Int. J. Mol. Biol.: Open Access* **2**, 63 (2017).
8. *H.A. Grebneva*, *Int. J. Mol. Biol.: Open Access* **3**, 125 (2018).
9. *E.A. Grebneva*, *ФТВД* **27**, № 3, 131 (2017).
10. *E.A. Grebneva*, *Теория тепловой релаксации энергии возбуждения водородных связей в ДНК. Ее вклад в ультрафиолетовый мутагенез*, LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrucken, Germany (2019).
11. *J.D. Watson, F.H.C. Crick*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **18**, 123 (1953).
12. *E.A. Grebneva, К.Б. Толпыго*, *Ж. структ. химии* **26**, № 4, 65 (1985).
13. *H.A. Grebneva*, *J. Mol. Struct.* **296**, 127 (1993).
14. *E.A. Grebneva*, *Ж. структ. химии* **38**, 422 (1997).
15. *O. Matsuoka, E. Clementi, M. Yoshimine*, *J. Chem. Phys.* **64**, 1351 (1976).
16. *E.A. Grebneva, К.Б. Толпыго*, *Ж. структ. химии* **26**, № 5, 71 (1985).
17. *N.F. Mott, M.J. Littleton*, *Trans. Faraday Soc.* **34**, 485 (1938).
18. *С.И. Пекар*, *Исследования по электронной теории кристаллов*, Гос. изд-во техн.-теорет. лит., Москва (1951).
19. *E.A. Grebneva, К.Б. Толпыго*, *Укр. физ. журн.* **33**, 1456 (1988).
20. *E.A. Grebneva, К.Б. Толпыго*, *Укр. физ. журн.* **34**, 1791 (1989).
21. *К.В. Толпыго, H.A. Grebneva*, *Int. J. Quant. Chem.* **57**, 219 (1996).
22. *H.A. Grebneva, К.В. Толпыго*, *Int. J. Quant. Chem.* **62**, 115 (1997).
23. *E.A. Grebneva, К.Б. Толпыго*, *Укр. физ. журн.* **34**, 832 (1989).
24. *H.A. Grebneva, К.В. Толпыго*, *Studia Biophysica* **135**, 115 (1990).
25. *E.A. Grebneva*, *Укр. физ. журн.* **37**, 1636 (1992).
26. *E.A. Grebneva*, *Докл. НАН Украины* № 2, 73 (1994).
27. *E.A. Grebneva*, *Мол. Биол.* **28**, 805 (1994).
28. *H.A. Grebneva*, *Biopolym. Cell* **18**, 205 (2002) [in Russian].
29. *H.A. Grebneva*, *J. Mol. Struct.* **645**, 133 (2003).
30. *E.A. Grebneva*, *Мол. Биол.* **48**, 531 (2014).
31. *H.A. Grebneva*, *J. Phot. Mat. Techn.* **1**, № 2, 19 (2015).
32. *E.A. Grebneva*, *Доп. НАН України* № 5, 144 (2015).
33. *Н.И. Остапенко, Ю.А. Скрышевский, А.К. Кадашук, Ю.В. Рубин*, *Известия АН СССР. Сер. физ.* **54**, 445 (1990).

34. K. Bebenek, L.C. Pedersen, T.A. Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 1862 (2011).
 35. W. Wang, H.W. Hellinga, L.S. Beese, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 17644 (2011).
 36. Е.А. Гребнева, J. Oncology Res. **1**, № 2, 24 (2019).
 37. C. Tomasetti, B. Vogelstein, Science **347**, 78 (2015).

H.A. Grebneva

SEMIEMPIRICAL POTENTIAL FUNCTION
 BY TOLPYGO AND GREBNEVA AND ITS CONTRIBUTION
 TO THE SUBSTANTIATION OF POLYMERASE-TAUTOMERIC MODELS

A semi-empirical potential function by Tolpygo and Grebneva for protons of hydrogen (H) bonds is developed, which is valid for different lengths of H-bonds. A method is suggested that allows finding the ground and several excited states of the proton analytically and with high accuracy. The proton wave functions are found for various hydrogen bond lengths. Potential curves for a wide range of the lengths of hydrogen bonds in a water dimer are plotted. Application of these curves allowed us to develop a mechanism for the formation of rare tautomeric forms of paired DNA bases. The obtained results become a quantum-mechanical basis of polymerase-tautomeric models for ultraviolet mutagenesis, radiation-induced bystander effects, and radiation-induced genomic instability. The experimental data confirm the polymerase-tautomeric models.

Keywords: hydrogen bonds, semi-empirical potential function for hydrogen bonds, rare tautomeric forms of DNA bases, ultraviolet mutagenesis, radiation-induced bystander effects, radiation-induced genomic instability.

Fig. Proton potentials for varied length of hydrogen bonds R obtained by taking into account the anharmonicity and the quantum nature of the proton motion: $-\cdot-\cdot-\cdot-$ $R_0 = 2.962$, $-\cdot-$ $R_1 = 2.38$, $-\cdot-\cdot-$ $R_2 = 2.962$, $\square-\square-\square$ $R_3 = 3.174$, $\times-\times-\times$ $R_4 = 3.696$, $\circ-\circ-\circ$ $R_5 = 4.232$, $\triangle-\triangle-\triangle$ $R_6 = 4.76$, $-\cdot-\cdot-\cdot-\cdot-$ $R_7 = 5.819$ [14]