

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Клочков Алексей Александрович

КОНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ЛИНЕЙНЫХ И ПРИВИТЫХ  
АМФИФИЛЬНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Специальности: 02.00.06 — Высокомолекулярные соединения  
01.04.07 — Физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва - 2007

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Научные руководители:

доктор физико-математических наук

профессор Хохлов Алексей Ремович,

доктор физико-математических наук

Василевская Валентина Владимировна.

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук

Даринский Анатолий Анатольевич,

доктор физико-математических наук

Кудрявцев Ярослав Викторович.

Ведущая организация: Тверской Государственный Университет

Защита состоится “ 31 ” октября 2007 г. в 16 час. 30 мин. на заседании Диссертационного Совета Д501.002.01 в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, аудитория ЮФА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан “ \_\_\_\_\_ ” 2007 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета

в МГУ им. М.В. Ломоносова

кандидат физико-математических наук

Т.В. ЛАПТИНСКАЯ

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Амфифильные макромолекулы содержат группы, имеющие различное сродство к полярным и неполярным растворителям. Различный характер взаимодействий звеньев, включенных в единую цепь, с растворителем и между собой приводит к возникновению в растворах и расплавах таких макромолекул сложных микропорядоченных состояний, что обуславливает широкое применение амфифильных макромолекул в самых различных областях.

В амфифильных макромолекулах гидрофильные и гидрофобные звенья могут чередоваться в цепи случайным образом, располагаться блоками или формировать гребнеобразные макромолекулы, в которых к остову гидрофобной или гидрофильной основной цепи привиты, соответственно, гидрофильные или гидрофобные боковые цепи.

Более того, часто отдельное мономерное звено может включать как гидрофильные, так и гидрофобные группы. В этом случае говорят, что макромолекула является амфифильной на уровне отдельного мономерного звена. Линейными амфифильными макромолекулами являются практически все водорастворимые полимеры, в том числе белки и одиночные нити макромолекул ДНК. В связи с этими фактами линейные амфифильные макромолекулы могут рассматриваться как макромолекулы, наиболее эффективно моделирующие природные макромолекулы, в первую очередь белки.

Особенности функционирования макромолекул в живой природе во многом определяются их конформационными свойствами. С другой стороны, знание механизма, определяющего конформационные свойства амфифильных макромолекул, необходимо для создания «умных материалов» на основе амфифильных макромолекул и варьирования их свойств.

Эти два обстоятельства обуславливают важность и актуальность изучения конформационных свойств амфифильных макромолекул как в плане развития наших представлений о механизме самоорганизации биологических макромолекул, так и для создания новых функциональных материалов.

**Цель работы.** Целью данной работы является исследование конформационных свойств амфифильных линейных и привитых макромолекул в селективных растворителях в зависимости от структурных параметров цепей (плотности пришивки и степени полимеризации боковых цепей, степени полимеризации основной цепи, статистики распределения амфифильных групп).

**Научная новизна.** Впервые методами численного моделирования изучены конформационные свойства амфифильных линейных и привитых макромолекул. Обнаружено явление микрофазного расслоения в глобулах гребнеобразных сополимеров с притягивающимися мономерными звеньями боковых цепей. Показано, что в таких макромолекулах образуются внутримолекулярные кластеры предпочтительного размера, агрегационное число которых не зависит от степени полимеризации основной цепи.

Впервые исследованы линейные сополимеры амфифильных  $\mathcal{A}$  и гидрофобных  $\mathcal{H}$  мономерных звеньев с различными статистиками распределения звеньев вдоль цепи. Показано, что регулярные  $\mathcal{HA}$  сополимеры формируют цилиндрические глобулы, а сополимеры с белковоподобной статистикой распределения звеньев  $\mathcal{H}$  и  $\mathcal{A}$  – глобулы сферической формы. Причем и в том, и в другом случае глобулы сополимеров из гидрофобных  $\mathcal{H}$  и амфифильных  $\mathcal{A}$  звеньев имеют структуру «плотное гидрофобное ядро – плотная гидрофильная оболочка», характерную для водорастворимых белков.

**Практическая значимость.** Полученные в работе результаты являются обоснованием перспективного метода описания конформационного поведения природных макромолекул, а также могут служить теоретическим базисом при создании новых функциональных материалов и полимерных веществ, схожих по своим свойствам с биомacroмолекулами. Некоторые из выводов работы, первоначально сформулированные как предсказания, уже получили экспериментальные подтверждения.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были доложены на Международной конференции по физике полимеров NIMC\_EAPS International Conference “Nonlinear Dynamics in Polymer Science and Related Fields”, Moscow 1999.; на II Всероссийском Каргинском симпозиуме «Химия и физика полимеров

в начале XXI века», Черноголовка, 2000; на Конференции студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок, Дубна, 2000; на Конференции студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок, Санкт-Петербург, 2000; на Конференции студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок, Пушкино, 2001; на Третьей Всероссийской Каргинской Конференции «Полимеры - 2004», Москва, 2004; на конференции, посвященной 50-летию юбилею Института элементоорганических соединений им А.Н. Несмеянова РАН "Modern trends in organoelement and polymer chemistry" International Conference Dedicated to 50<sup>th</sup> Anniversary of A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds (INEOS), Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, May 30 - June 4, 2004.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 3 статьи, а также 7 тезисов перечисленных выше конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и содержит 113 страниц, включая 36 рисунков и список литературы из 69 наименований.

### КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы основные цели, научная новизна и практическая значимость работы, приводится краткое содержание диссертации по главам.

**Первая глава** содержит обзор литературы по теме диссертационной работы. Кратко рассматриваются возможности, преимущества и недостатки основных методов компьютерного моделирования. Значительное внимание уделено рассмотрению методов моделирования сложных полимерных систем со связями: молекулярной динамики и Монте-Карло.

**Вторая глава** посвящена исследованию конформационных свойств амфифильных привитых макромолекул с притягивающимися мономерными звеньями боковых цепей, т.е. помещенных в хороший для основной цепи и плохой для боковых цепей растворитель.

Гребнеобразная макромолекула моделировалась на кубической решетке с периодическими граничными условиями. Моделирование производилось методом Монте-Карло с использованием модели цепи с флуктуирующей длиной связи.

Была изучена зависимость перехода клубок-глобула от структурных параметров макромолекулы: степени полимеризации боковых цепей  $n$  и плотности пришивки  $\sigma$  боковых цепей (параметр  $\sigma$  обратно пропорционален числу мономерных звеньев между точками пришивки боковых цепей  $m$ :  $\sigma=1/m$ ).

При построении зависимости величины среднеквадратичного радиуса инерции  $\langle R_g^2 \rangle$  от энергии взаимодействия привесков, постепенно увеличивалась энергия взаимодействия мономерных звеньев привесков  $\epsilon_{ss}$ , при этом в каждой точке вычислялся среднеквадратичный радиус инерции гребнеобразной макромолекулы  $\langle R_g^2 \rangle$ . Результаты вычислений для цепей из  $N=128$  звеньев и с различными значениями  $n$  представлены на рис. 1а.

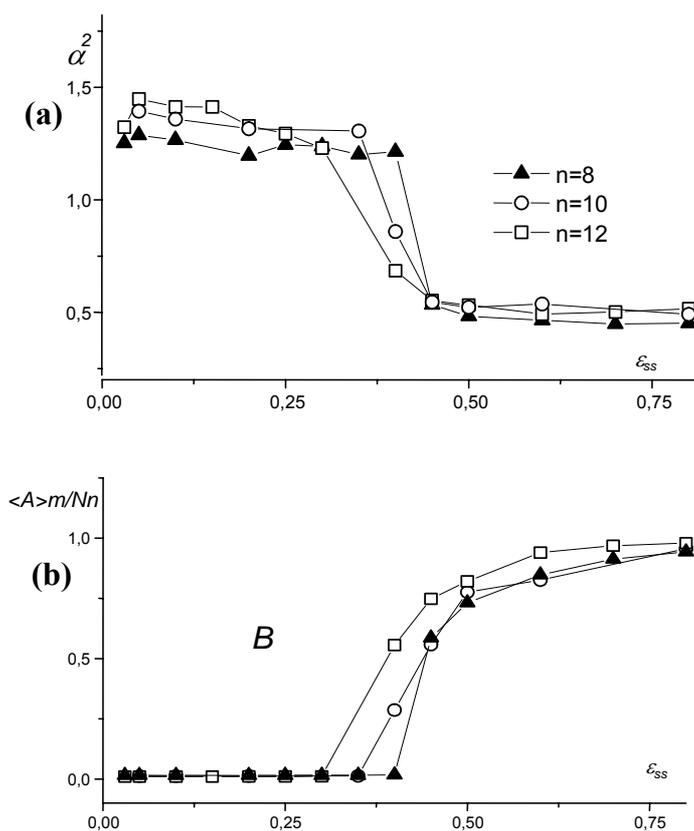
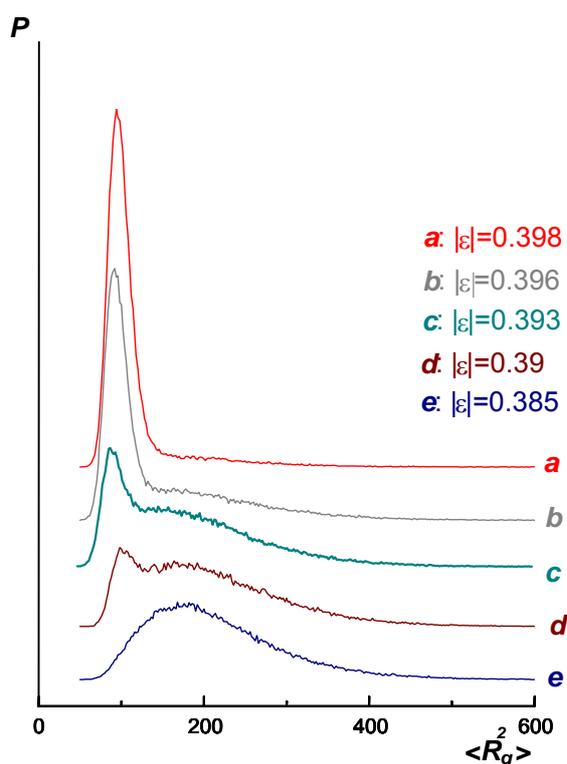


Рис. 1. Зависимости коэффициента набухания  $\alpha^2$  (a) и отношения  $\langle A \rangle m / Nn$  (b) гребнеобразной макромолекулы от энергии взаимодействия мономерных звеньев боковых цепей  $\epsilon_{ss}$  для  $N=128$  и различных значений степени полимеризации боковых цепей  $n$ .

Здесь же (рис. 1b) представлены соответствующие зависимости отношения  $\langle A \rangle m / Nn$ , где  $\langle A \rangle$  среднее агрегационное число кластеров, образованных боковыми цепями.

Отношение  $\langle A \rangle m / Nn$  характеризует долю мономерных звеньев боковых цепей, входящих в один кластер. Величина  $\langle A \rangle m / Nn$  равна нулю, когда процесс агрегации не происходит, и единице, когда все звенья боковых цепей формируют единственный кластер.

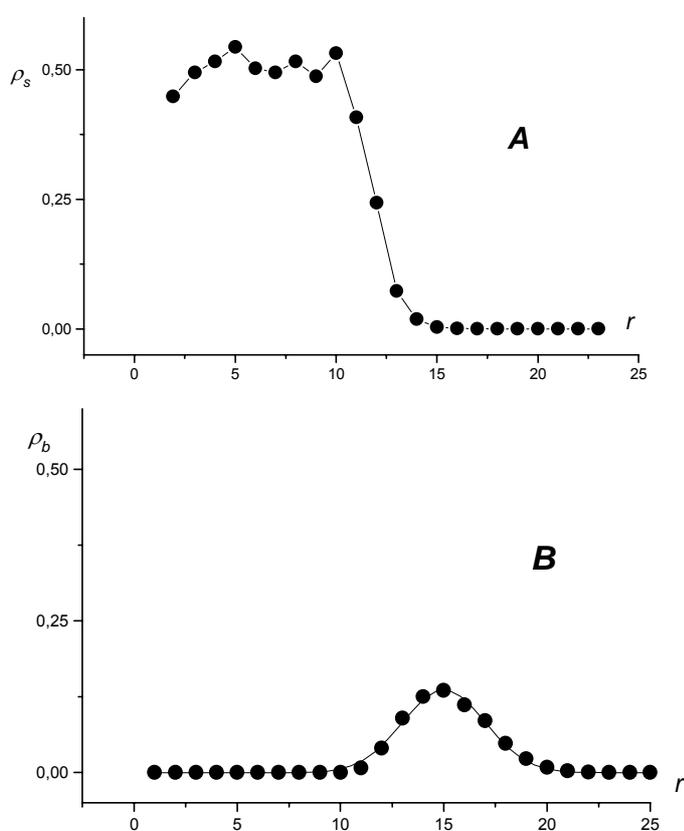


**Рис. 2.** Гистограммы распределения среднеквадратичного радиуса инерции  $\langle R_g^2 \rangle$  в окрестности точки фазового перехода клубок-глобула ( $N=128$ ,  $n=10$ ).

На рис. 2 показаны гистограммы распределения среднеквадратичного радиуса инерции  $\langle R_g^2 \rangle$  гребнеобразной макромолекулы в области критической энергии  $\epsilon_{ss}^{cr}$  при различных значениях энергии притяжения мономерных звеньев боковых цепей  $\epsilon_{ss}$ . Видно, что вблизи точки перехода клубок-глобула гистограмма имеет два хорошо различимых максимума, соответствующих клубковому и глобулярному состоянию макромолекулы.

Бимодальность гистограммы распределения среднеквадратичного радиуса инерции гребнеобразной макромолекулы в области точки перехода  $\varepsilon_{ss}^{cr}$  позволяет классифицировать переход клубок-глобул макромолекулы гребнеобразного сополимера с притягивающимися мономерными звеньями боковых цепей как фазовый переход первого рода.

Была изучена внутренняя структура глобулярного ядра. Типичные результаты расчетов плотности внутри глобулы гребнеобразной макромолекулы ( $N=512$ ,  $n=6$ ,  $m=10$  и  $\varepsilon_{ss}=0,6$ ) представлены на рис. 3.



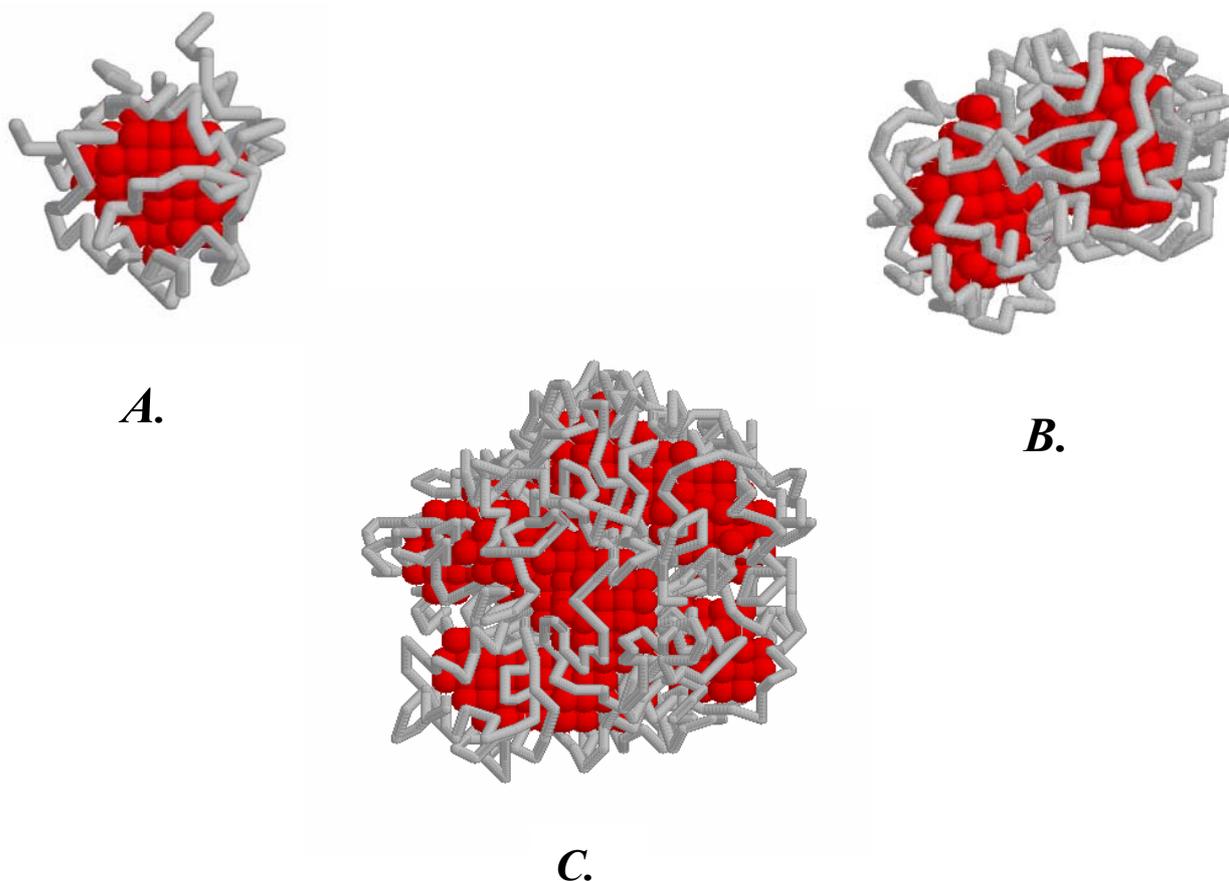
**Рис. 3.** Плотность  $\rho$  мономерных звеньев боковых цепей (рис 3.A) и основной цепи (рис3.B) в глобуле гребнеобразной макромолекулы как функция расстояния от центра инерции макромолекулы  $r$ .

Как можно видеть, локальная плотность  $\rho_s$  мономерных звеньев боковых цепей практически постоянна при  $r < 10$  ( $r$  измеряется в размерах ячейки решетки). В области с  $r=10$  до  $r=15$  плотность падает до нуля (рис.3A). С другой стороны, плотность мономерных звеньев основной цепи  $\rho_b$  равна нулю во всей области

изменения величины  $r$ , кроме узкого интервала в окрестности  $r=15$  (рис. 3B). Это означает, что глобула гребнеобразной макромолекулы имеет хорошо определенную структуру – ядро, полностью состоящее из звеньев боковых цепей и оболочку, сформированную мономерными звеньями основной цепи.

Детальный анализ структуры глобулы более длинной цепи показал, что строение глобулы в этом случае еще более сложное – внутри такой глобулы происходит микрофазное расслоение.

На рис. 4 представлены мгновенные снимки сколлапсированных гребнеобразных макромолекул ( $m=4$ ,  $n=4$ ) различных степеней полимеризации  $N$ . Как можно видеть, при малых значениях  $N$  мономерные звенья боковых цепей формируют один кластер, при увеличении степени полимеризации основной цепи  $N$  формируется несколько кластеров, а основная цепь извивается по поверхности мицелл и между мицеллами.

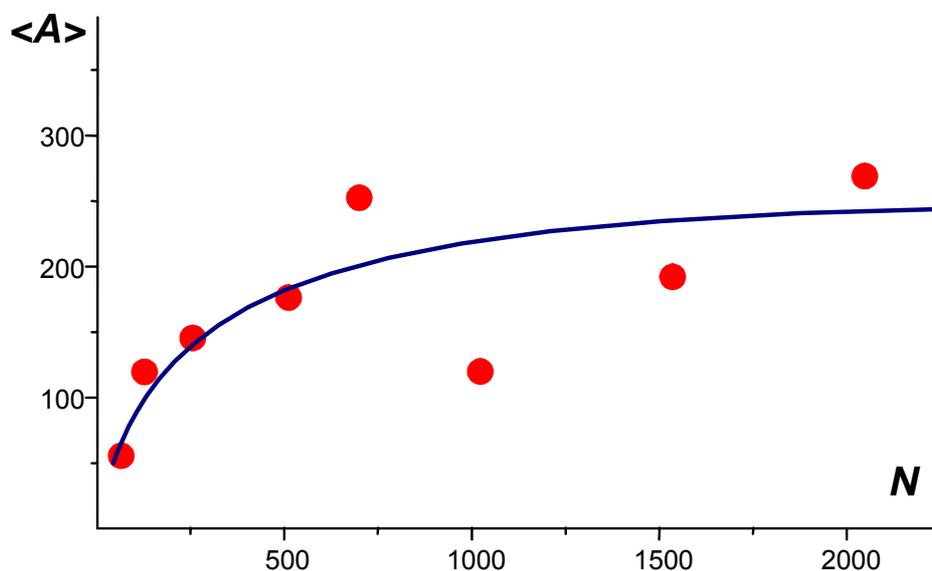


**Рис. 4.** Мгновенные снимки гребнеобразных макромолекул с различными степенями полимеризации  $N=128$ (A), 256 (B), 2048 (C);  $n=4$ ,  $m=4$ ,  $\epsilon_{SS}=0,6$ .

Причина такого расслоения заключается в том, что при этом компенсируется энтропийно невыгодное расположение главной цепи на поверхности глобулярного ядра.

Число мицелл увеличивается с ростом числа мономерных звеньев основной цепи  $N$ . Из рис. 5 также можно заметить, что с ростом  $N$  величина  $\langle A \rangle$  сначала растет, а затем, начиная с  $N \sim 200$ , выходит на насыщение и в случае длинных цепей средний размер кластера не зависит от степени полимеризации цепи (см. рис. 5).

Анализ показал, что данное микрофазное расслоение с точки зрения зависимости от степени полимеризации боковых цепей отвечает режиму, промежуточному между режимом сильной и сверхсильной сегрегации.



**Рис. 5.** Зависимость среднего агрегационного числа кластера  $\langle A \rangle$  от степени полимеризации основной цепи  $N$ .

К настоящему времени явление микрофазного расслоения с образованием кластеров с оптимальным размером обнаружено экспериментально, а также подтверждено в независимых компьютерных экспериментах.

Третья глава посвящена исследованию линейных амфифильных макромолекул – сополимеров гидрофобных  $\mathcal{H}$  и амфифильных  $\mathcal{A}$  звеньев. Каждое амфифильное звено  $\mathcal{A}$  содержит как гидрофобную, так и гидрофильную группу и состоит из двух бусинок – гидрофобной  $\mathcal{H}$  и гидрофильной  $\mathcal{P}$ .

Было изучено конформационное поведение *Н**А*-сополимеров с различными последовательностями *Н* и *А* мономерных звеньев (белковоподобной, регулярной альтернирующей, регулярной с чередующимися блоками *Н* и *А* мономеров).

В регулярном альтернирующем *Н**А*-сополимере *Н* и *А* звенья чередуются через одно звено, в регулярном трехблочном – они размещены блоками по три звена, в белковоподобном – их распределение отвечает статистике «полета Леви».

Приготовление белковоподобной *Н**А*-макромолекулы проходило в несколько этапов.

1. Сначала одиночная цепь, состоящая из гидрофобных мономерных звеньев, помещалась в кубическую ячейку с периодическими граничными условиями, размеры которой были много больше радиуса гидрофобного клубка. Уменьшением температуры добивались сворачивания гидрофобной макромолекулы в плотную глобулу (рис. 6*a*) и позволяли образовавшейся глобуле некоторое время релаксировать.
2. На втором шаге в ячейку добавлялось некоторое количество гидрофильных мономерных звеньев (рис. 6*b*). Эти звенья в дальнейшем будут адсорбироваться на поверхность гидрофобного ядра.

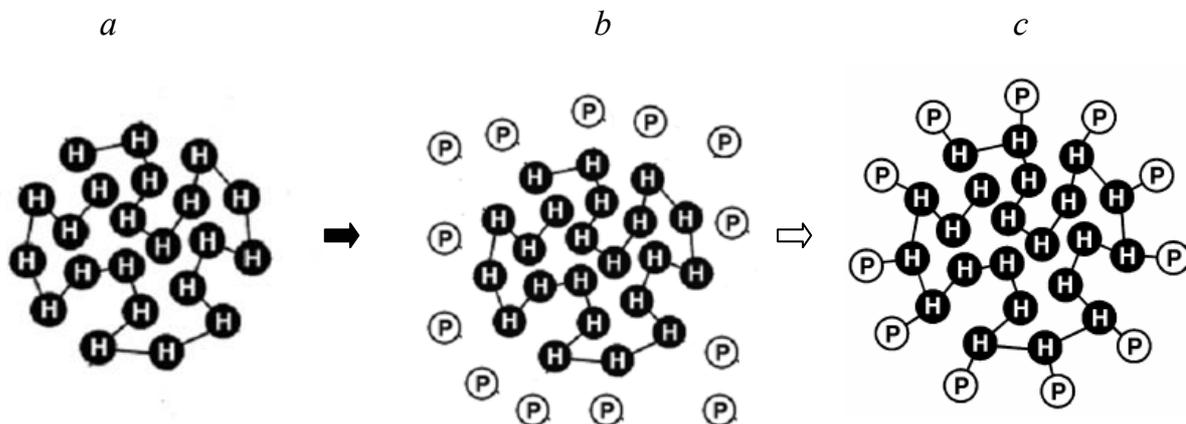
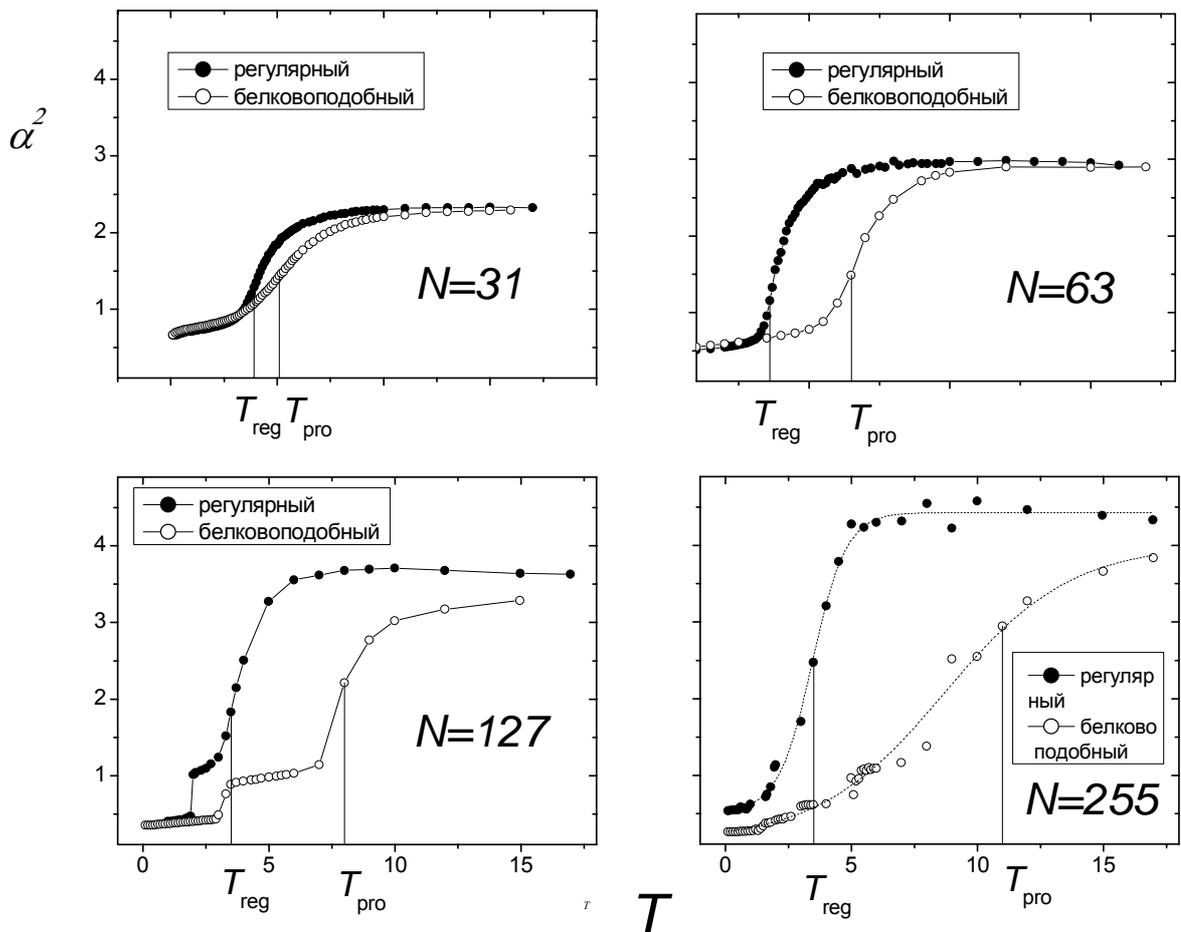


Рис. 6. Процедура «синтеза» белковоподобного *Н**А* сополимера.

3. На третьем шаге было «включено» притяжение между гидрофильными и гидрофобными мономерными звеньями. Гидрофильные звенья свободно флуктуировали в ячейке и приближались к гидрофобному ядру. Когда расстояние между гидрофильным и гидрофобным звеном становилось меньше  $2^{1/6}$ , образовывалась связь. Каждое гидрофильное

мономерное звено могло образовать связь только с одним гидрофобным звеном и наоборот. Так продолжалось до тех пор, пока число адсорбированных мономерных звеньев не становилось равным половине мономерных звеньев гидрофобного ядра (рис. 6с), тогда «синтез» прекращался и оставшиеся в ячейке свободные полярные звенья удалялись.

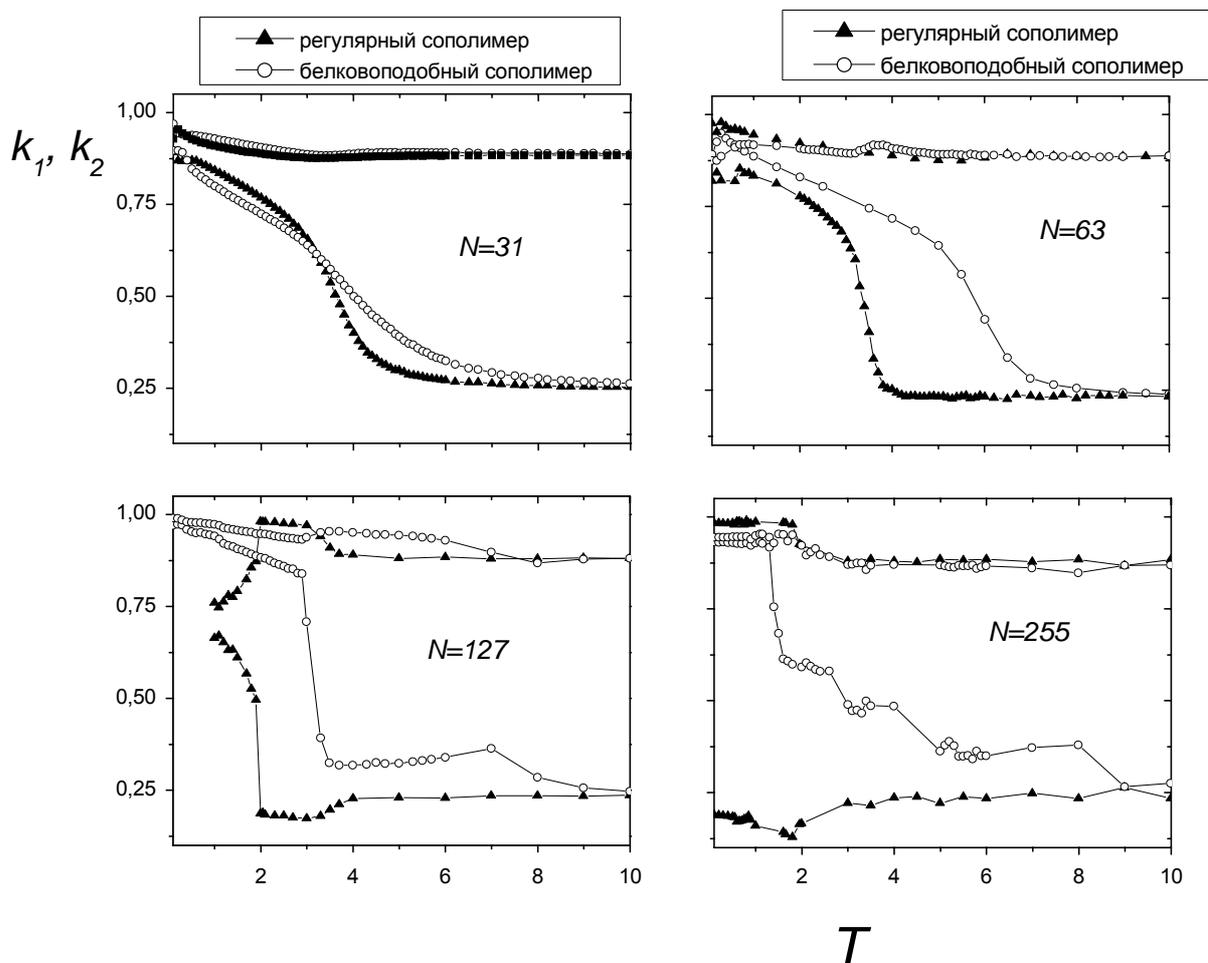
Из графиков зависимости параметра набухания  $\alpha$  от температуры  $T$  (рис. 7) нетрудно заметить, что при переходе из клубковой в глобулярную конформацию белковоподобная макромолекулы коллапсирует при гораздо меньших температурах по сравнению с аналогичной регулярной макромолекулой. Причем, чем больше степень полимеризации макромолекулы  $N$ , тем значительнее разница в температурах перехода.



**Рис. 7.** Зависимости коэффициента набухания  $\alpha$  от температуры  $T$  для белковоподобного и регулярного ЖА сополимеров различной степени полимеризации  $N$ . На графиках указаны температуры перехода клубок-глобула белковоподобного  $T_{pro}$  и регулярного  $T_{reg}$  сополимеров.

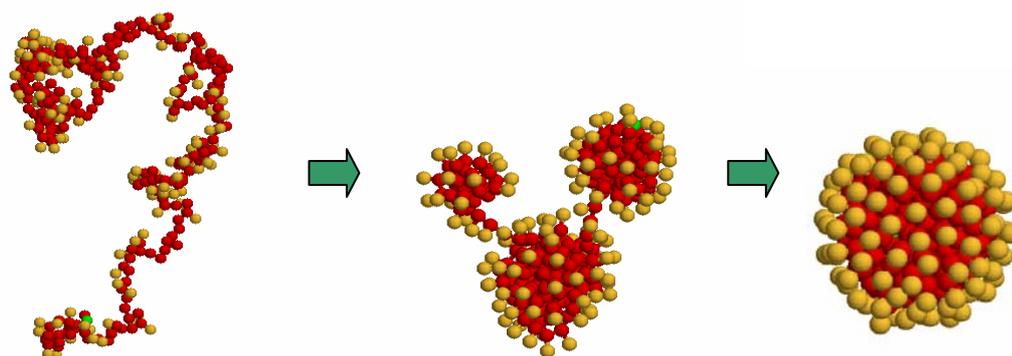
На рис. 8 представлены зависимости факторов формы  $k_1$  и  $k_2$  от качества растворителя для макромолекул с различными степенями полимеризации  $N$ . Величины  $k_1$  и  $k_2$  ( $k_1 \leq k_2$ ) определяются отношениями компонентов тензора инерции, приведенного к диагональному виду, и их соотношение позволяет судить о форме макромолекулы. Так, для сферы  $k_1 = k_2 = 1$ , для цилиндра  $k_1 \rightarrow 0, k_2 = 1$ , для диска  $k_1 = k_2 \rightarrow 0,5$ .

Как можно видеть из рис. 8, белковоподобная макромолекула всегда в глобулярной конформации (при низких температурах) имеет сферическую форму, а форма глобулы регулярного сополимера зависит от его степени полимеризации  $N$ . Так при  $N = 31$  и  $63$  регулярные макромолекулы формируют сферические, при  $N = 127$  – дискообразные, а при  $N = 255$  – стержнеобразные глобулы.



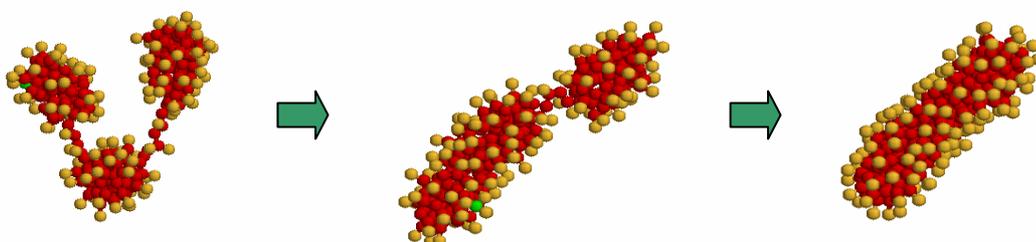
**Рис. 8.** Зависимости параметров формы  $k_1$  и  $k_2$  от температуры  $T$  для белковоподобного и регулярного ЖА сополимеров различной степени полимеризации  $N$ .

На рис. 9-10 представлены мгновенные фотографии конформаций относительно длинных макромолекул ( $N=255$ ) при различных значениях температуры. Как можно видеть из рис. 9, в процессе перехода клубок-глобула белковоподобная макромолекула сначала формирует структуру из нескольких сферических мицелл разного размера, которые затем сливаются в глобулу правильной сферической формы.



**Рис. 9.** Мгновенные снимки белковоподобного *ЖА* сополимера при различной температуре  $T$  ( $N=255$ ). Температура  $T$  уменьшается по направлению стрелки.

Регулярная альтернирующая макромолекула *ЖА*-сополимера при переходе клубок-глобула так же формирует схожую по морфологии конформацию. В этом случае вначале образуются сферические мицеллы приблизительно одинакового размера. А по мере ухудшения качества растворителя эти мицеллы укрупняются и приобретают продолговатую форму (рис.10).



**Рис. 10.** Регулярный альтернирующий *ЖА* сополимер при различной температуре  $T$  ( $N=255$ ). Температура  $T$  уменьшается по направлению стрелки.

Завершается коллапс такой макромолекулы формированием цилиндрической глобулы, в которой гидрофобные группы образуют плотную сердцевину, а гидрофильные – плотную оболочку на ее поверхности.

**В заключении** сформулированы основные результаты и выводы.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Были проведены компьютерные исследования конформационных свойств амфифильных линейных и привитых макромолекул. Показано, что переход клубок-глобула в таких макромолекулах происходит сложным образом и сопровождается процессами микроструктурирования. Исследования проводились для двух различных типов макромолекул – гребнеобразных макромолекул с притягивающимися боковыми цепями и линейных сополимеров из амфифильных и гидрофобных мономерных звеньев. На основе проведенных исследований могут быть сделаны следующие выводы:

- Переход клубок - глобула амфифильных привитых макромолекул может быть классифицирован как фазовый переход первого рода, он происходит в весьма узкой температурной области и сопровождается агрегацией звеньев боковых цепей. Точка перехода клубок-глобула таких макромолекул смещается в область более хорошего растворителя по мере увеличения степени полимеризации боковых цепей и росте плотности их пришивки. Глобула амфифильной гребнеобразной макромолекулы имеет сложную, зависящую от длины основной цепи структуру. При относительно небольших степенях полимеризации основной цепи практически все звенья боковых цепей входят в одну и ту же мицеллу. Центральная часть такой глобулы – это сферическое ядро, образованное звеньями боковых цепей, а основная цепь расположена на поверхности этого сферического ядра. При высоких степенях полимеризации основной цепи боковые цепи внутри глобулы формируют несколько плотных сферических ядер, а основная цепь извивается по поверхности этих ядер и между ними. Среднее агрегационное число кластера растет с ростом степени полимеризации основной цепи  $N$  при невысоких значениях  $N$  и практически не зависит от  $N$  в случае длинных

макромолекул. Режим микрофазного расслоения внутри глобулы гребнеобразного сополимера является промежуточным между режимами сильной и сверхсильной сегрегации.

- *НА* сополимеры с белковоподобной статистикой распределения гидрофобных *Н* и амфифильных *А* звеньев могут быть получены в результате «химической» адсорбции гидрофильных мономерных звеньев на поверхности предварительно скомпактизованной глобулы линейной гидрофобной цепи.
- *НА* сополимеры с регулярной и регулярно блочной структурой претерпевают переход из клубковой в глобулярную конформацию при более низких температурах *T*, чем белковоподобные сополимеры. В глобулярной конформации макромолекулы с регулярным распределением *Н* и *А* звеньев в зависимости от степени полимеризации формируют сферические, дискообразные или стержнеобразные структуры, белковоподобная макромолекула всегда образует сферическую глобулу.
- Вне зависимости от статистики распределения звеньев глобулы *НА* сополимеров имеют плотное гидрофобное ядро и плотную гидрофильную оболочку.

**Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:**

- [1] *V.V. Vasilevskaya, A.A. Klochkov, P.G. Khalatur, A.R. Khokhlov, G. ten Brinke*, Microphase separation within a comb copolymer with attractive side chains: A computer simulation study // *Macromol. Theory Simulation*. **2001**, 10, P. 389-394
- [2] *А.А.Клочков, В.В.Василевская, П.Г. Халатур, А.Р. Хохлов*, Математическое моделирование гребнеобразных сополимеров с притягивающимися боковыми цепями // *Физико-химия полимеров*, Тверь, **2004**, Вып. 10, С. 87 – 91
- [3] *V.V. Vasilevskaya, A.A. Klochkov, A.A. Lazutin, P.G. Khalatur, A. R. Khokhlov*. *НА (Hydrophobic/Amphiphilic) Copolymer Model: Coil-Globule Transition versus Aggregation* // *Macromolecules* **2004**, 37, P. 5444-5460

- [4] *A.A. Klochkov, V.V. Vasilevskaya* Conformational Properties of Comb-like Copolymers: Computer Simulation // NIMC\_EAPS International Conference “Nonlinear Dynamics in Polymer Science and Related Fields”, Moscow 1999, p.38
- [5] *A.A. Клочков, В.В. Василевская* Переход клубок-глобула в гребнеобразных сополимерах // II Всероссийский Каргинский симпозиум «Химия и физика полимеров в начале XXI века», Черноголовка, **2000**, С2-49.
- [6] *A.A. Клочков.* Переход клубок-глобула в гребнеобразных макромолекулах // Конференция студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок, Дубна, **2000**, с.27.
- [7] *A.A. Клочков* О роде перехода клубок-глобула в макромолекуле гребнеобразного сополимера // Конференция студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок, Санкт-Петербург, **2000**, 18-20 октября, с. 49.
- [8] *A.A. Клочков.* Влияние жесткости на микрофазное расслоение внутри гребнеобразных сополимеров // Конференция студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок, Пущино, **2001**, 13-14 июня, с. 26.
- [9] *A.A. Клочков, В.В. Василевская, П.Г. Халатур, А.Р. Хохлов.* Компьютерное моделирование перехода клубок-глобула макромолекулы гидрофобно-амфифильного сополимера // Третья Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры 2004», 27 января - 1 февраля **2004** г., Москва, МГУ, Том 2, с. 186.
- [10] *A.A. Klochkov, V.V. Vasilevskaya, P.G. Khalatur, A.R. Khokhlov.* Influence of grafting point distribution on structure of comb copolymer globules // Modern trends in organoelement and polymer chemistry, International Conference Dedicated to 50<sup>th</sup> Anniversary of A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds (INEOS), Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, May 30 - June 4, **2004**. P 38