

В. А. Сорокин, В. А. Валеев,
Г. О. Гладченко, Ю. П. Благой, Л. Ф. Суходуб

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ПРЕПАРАТА ЭТОНИЯ С ПРИРОДНОЙ ДНК

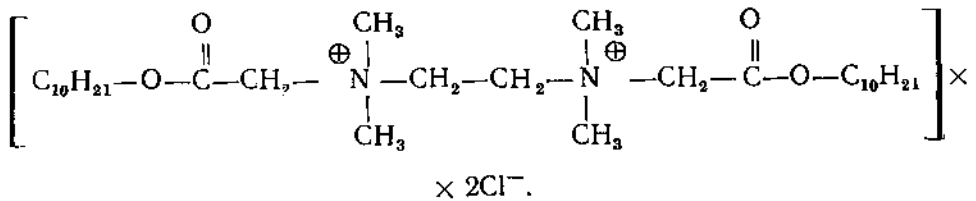
Методами дифференциальной УФ-спектроскопии и термической денатурации изучено изменение свойств природной ДНК в присутствии противомикробного препарата этония (Е). В области концентраций $(0,1-3) \cdot 10^{-5}$ М Е происходит возрастание термостабильности, расширение интервала перехода спираль — клубок и изменение формы кривой плавления, которая становится асимметричной. Эти эффекты обусловлены взаимодействием находящихся на небольшом расстоянии между собой бис-четвертичных азотов этония с фосфатами ДНК. В том же диапазоне концентраций этоний связывается и с основаниями, вызывая частичное плавление ДНК, которое проявляется в гиперхромизме спектра поглощения. При $[E] > 7 \cdot 10^{-5}$ М гиперхромизм сменяется гиперхромизмом, вызванным переходом одноцепочечных расплавленных участков в компактную форму. Взаимодействие Е с основаниями уменьшает термостабильность ДНК и является АТ-специфичным: наблюдается очень сильное понижение температуры начала плавления, тогда как температура окончания его меняется слабо. Возрастание различий в стабильности АТ- и ГЦ-пар приводит к тому, что при $[E] > 5 \times 10^{-5}$ М переход спираль — клубок ДНК осуществляется в две стадии, соответствующая плавлению участков, температура плавления которых отличается на 25 °С. При $[E] > 4 \cdot 10^{-4}$ М этоний индуцирует образование агрегатов, сопровождающееся осаждением комплекса.

Введение. В последние годы на Украине синтезирован ряд эффективных лекарственных препаратов на основе бис-четвертичных аммониевых солей, обладающих сильным антимикробным действием. К ним, в частности, относятся декаметоксин и этоний, принадлежащие к той же группе веществ, в которую входят антибиотики нетропсин и дистамицин, их производные, а также красители типа SN. Предполагается, что одна из причин терапевтического действия этих соединений заключается в селективности их взаимодействия с нуклеотидами ДНК по неинтеркалирующему типу. Несмотря на сравнительно большой объем экспериментальных и теоретических данных об особенностях взаимодействия этой группы веществ с ДНК (см., например, [1—4]), в настоящее время не установлено, какие типы из них — кулоновские, ван-дер-ваальсовы или водородные связи — определяют специфичность взаимодействия подобных соединений с нуклеиновыми кислотами. Этот вопрос может быть решен при изучении лигандов различной структуры. Например, в отличие от дистамицина и нетропсина пентамидин, SN 18071, декаметоксин [1—6] не способны образовывать водородные связи с гетероатомами оснований ДНК. К этой группе вещества относится и являющийся объектом настоящего исследования этоний, структурной особенностью которого по сравнению с перечисленными выше веществами является отсутствие колец в его молекулах, а также очень малое расстояние между бис-четвертичными азотами, которые располагаются не вблизи концов цепочечной молекулы, что характерно для изученных ранее веществ [1—6], а в ее центре.

Цель настоящей работы состояла в выяснении влияния структурных особенностей этония на параметры перехода спираль — клубок ДНК, ее конформацию, а также на селективность связывания этония с нуклеотидами этого полимера.

© В. А. Сорокин, В. А. Валеев, Г. О. Гладченко, Ю. П. Благой, Л. Ф. Суходуб, 1994

Материалы и методы. Объектами исследования служили высокополимерная ДНК тимуса теленка ([ГЦ] ~ 42 % [1], содержание белка, определенное по методу Лоури [7], — менее 1 %), динатриевые соли 2'-дезоксинуклеозид-5'-фосфатов фирмы «Serva» (ФРГ), а также синтезированный в Ин-те орг. химии АН Украины этоний (1,2-этилен-бис-[N-диметил(карбдецилоксиметил)-аммоний]дихлорид), имеющий следующую структурную формулу



Все препараты растворяли в ацетатном буфере, содержащем 10^{-2} М Na^+ , рН 6. Концентрацию фосфора ДНК (Р) определяли по молярному коэффициенту экстинкции ($6600 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при $\nu_m = 38\,500 \text{ см}^{-1}$ [1]), этония ([Е]) — по массе. Дифференциальные УФ-спектры ДНК (ДУФС), индуцированные этонием (ΔА), регистрировали на спектрофотометрах «Specord UVVIS» и «Specord M-40» фирмы «Carl Zeiss Jena». Использовали 4-кюветную схему измерения [8], что исключало влияние на ДУФС ДНК поглощения этония, молярный коэффициент экстинкции которого при $46\,000$, $38\,000$ и $30\,000 \text{ см}^{-1}$ составлял соответственно при 20 и $86,5^\circ\text{C}$ (в скобках) 91 (98), 8 (10), 2 (3) $\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. В присутствии этония в растворах нативной (н) и денатурированной (д) ДНК наблюдались рассеяние света, что следовало из появления зависящей от времени и [Е] оптической плотности при $\nu < 32\,000 \text{ см}^{-1}$, где ДНК не поглощает. Чтобы уменьшить его искажающее влияние, ДУФС записывали сразу после добавления этония и последующего перемешивания раствора, а при измерении кривых плавления раствор нагревали с максимальной возможной скоростью — $1,8$ град/мин. Кривые плавления записывали автоматически, используя также дифференциальную схему измерения [6]. По окончании плавления при $t = 96^\circ\text{C}$ измеряли изменение оптической плотности, обусловленное тепловой денатурацией (ΔА_н), в которое вводили поправку на тепловое расширение раствора в рабочей кювете [9]. Все приведенные в работе ДУФС являются результатом нормирования изменения оптической плотности по концентрации ДНК ($P = (1 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ M}$): $\Delta\epsilon = \Delta A / P$.

Зависимость степени спиральности ДНК (свободной и в присутствии этония) от температуры рассчитывали по формуле

$$\Theta(t) = 1 - [\Delta A(t) / \Delta A_n] \nu_m, \quad (1)$$

где $\Delta A(t)$ — изменение оптической плотности раствора ДНК при нагреве от t_0 до t . По кривым плавления определяли температуры перехода спираль — клубок (t_0): начала (t_s), середины (t_m) и конца (t_f) [10].

Результаты и обсуждение. Этоний индуцирует гиперхромизм всего спектра поглощения ДНК (рис. 1, а) уже при концентрациях $\sim 10^{-6} \text{ M}$, т. е. на два порядка меньших, чем декаметоксин [6]. При $[E]_i > 3 \times 10^{-5} \text{ M}$ этот гиперхромизм частично обусловлен рассеянием света, вклад которого в общее изменение оптической плотности раствора можно учесть, используя метод экстраполяции и уравнение Ангстрема [8, 11] по формуле [6]

$$\Delta A_a = \Delta A - \Delta A_s = \Delta A - \Delta A_s (\nu/\nu_0)^n, \quad (2)$$

где ΔA — экспериментально определяемое суммарное изменение оптической плотности раствора ДНК, индуцированное этонием; ΔA_a и ΔA_s — изменение оптической плотности, обусловленное соответственно изменением поглощения ДНК и рассеянием света; $\Delta A_{s_0} = \Delta A_s$ при $\nu = \nu_0 = 28\,000 \text{ см}^{-1}$; n — показатель экспоненты в формуле Ангстрема [8],

определенный по волновой зависимости ΔA_s в диапазоне $\nu = (16-32) \times 10^3 \text{ см}^{-1}$.

Рассчитанный по формуле (2) спектр изменения поглощения ДНК в присутствии $5 \cdot 10^{-5} \text{ М Е}$ (кривая 1, рис. 1, а) представляет собой сумму [6]

$$\Delta A_s/P = \Delta \epsilon_a = \Delta \epsilon_b + \Delta \epsilon_c, \quad (4)$$

где $\Delta \epsilon_b$ — координационная составляющая ДУФС, обусловленная изменением энергии и сил осцилляторов электронных переходов оснований при их взаимодействии с этонием; $\Delta \epsilon_c$ — конформационная составляющая, обусловленная переходом спираль — клубок ДНК. Поскольку при

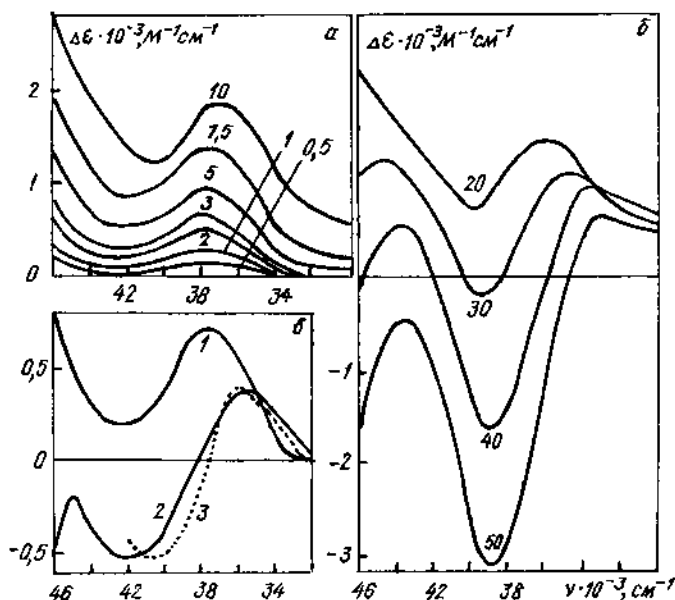


Рис. 1. Дифференциальные УФ-спектры ДНК, индуцированные этонием: а, б — 20 °С (цифры возле кривых — $[E] \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$); а ($5 \cdot 10^{-5} \text{ М Е}$) — 1—20 °С; 2—88 °С; 3 — близкий к предельному ДУФС смеси отдельных дезоксирибонуклеотидов, соответствующий их относительному содержанию в ДНК ($[Г] = [Ц] = 0,2$; $[А] = [Т] = 0,3$) в присутствии $5,5 \cdot 10^{-3} \text{ М Сu}^{2+}$ (10^{-3} М Na^+ , рН 6, 25 °С); спектры 1 и 2 рассчитаны по формуле (2), где $n=4$

88 °С ДНК находится в клубкообразном состоянии, то в этом случае $\Delta \epsilon_c = 0$ и кривая 2 (рис. 1, а) представляет собой спектр $\Delta \epsilon_b$. Его обращение в нуль при $\nu = 38\,300 \text{ см}^{-1}$ означает, что вблизи этого волнового числа изменение оптического поглощения ДНК определяется только индуцированными этонием конформационными переходами. Таким образом, можно предположить, что возрастание поглощения при $\nu = 38\,000 \text{ см}^{-1}$ вплоть до $[E] = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ (рис. 1, а, 2) обусловлено частичным плавлением полимера. Используя данные рис. 2, можно рассчитать кривые фазового равновесия комплекса ДНК+Е при комнатной температуре по формуле [6]

$$\Theta([E]) = 1 - [\Delta \epsilon_a([E]) / \Delta \epsilon_h]_{\nu} \quad (4)$$

или

$$\Theta([E]) = [\Delta \epsilon_{h_k}([E]) / \Delta \epsilon_h]_{\nu}, \quad (5)$$

где $\Delta \epsilon_h$ и $\Delta \epsilon_{h_k}$ — изменение экстинкции свободной ДНК и ее комплексов с этонием при нагревании от 20 до 96 °С; ν — волновое число, при котором спектр $\Delta \epsilon_b$ близок к нулю. Кривые фазового равновесия, рассчитанные по формулам (4) и (5), т. е. с использованием независимых измерений, удовлетворительно согласуются между собой, хотя соответствуют существенно различным временам выдержки: в первом случае —

около 2,5 мин для каждой точки, во втором — ~40 мин. Это означает, что кинетика изменения ДУФС обусловлена возрастанием числа рассеивающих центров, максимальное количество которых достигается при $7,5 \cdot 10^{-5}$ М Е: в диапазоне $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М} \leq [E] \leq 5 \cdot 10^{-4}$ М интенсивность рассеянного света (кривая 2, рис. 2) почти не меняется.

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что форма диаграмм равновесия спиральной и клубкообразной фаз ДНК в присутствии декаметоксина и этония практически совпадает. Хотя этоний, как будет показано ниже, может взаимодействовать с фосфатными группами ДНК, подобие структурных изменений, индуцируемых этонием и декаметоксином, слабо связывающимся с фосфатами [6], позволяет пред-

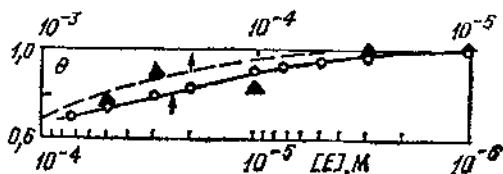
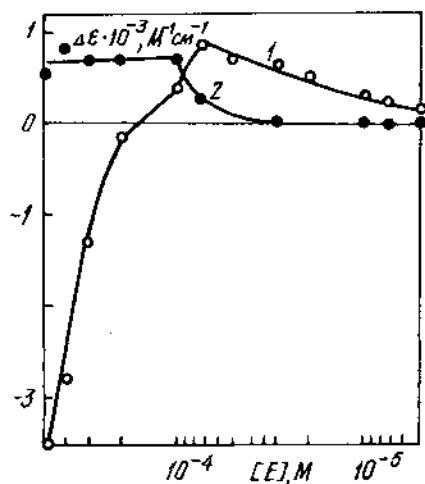


Рис. 3. Кривые фазового равновесия комплекса ДНК с этонием при 20 °С: ○ — рассчитана по формуле (4) ($\nu=38\,000 \text{ см}^{-1}$; $\Delta\epsilon_h=2910 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); ▲ — по формуле (5) ($\nu=38\,500 \text{ см}^{-1}$; $\Delta\epsilon_h=2870 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Штриховая линия — кривая фазового равновесия комплекса ДНК+декаметоксин, полученная в тех же условиях [6]

Рис. 2. Концентрационные зависимости интенсивности ДУФС нДНК при $\nu=38\,000 \text{ см}^{-1}$ (1 — $\Delta\epsilon_a$) и $\nu=32\,000 \text{ см}^{-1}$ (2 — $\Delta\epsilon_s$)

положить, что расплетание ДНК и в случае этония обусловлено его взаимодействием с основными макромолекулами. В присутствии этония эквивалентный эффект уменьшения степени спиральности достигается при концентрациях, в 25 раз меньших, чем в случае декаметоксина, что свидетельствует о более высоком сродстве этония к основаниям ДНК.

Как видно из рис. 1, б, при больших концентрациях этония форма ДУФС изменяется таким образом, что они полностью располагаются в области отрицательных значений $\Delta\epsilon$. Соответственно концентрационная зависимость $\Delta\epsilon_a$ при $\nu=38\,000 \text{ см}^{-1}$ проходит через максимум, расположенный при $7,5 \cdot 10^{-5}$ М Е (рис. 2). Эти данные показывают, что помимо перехода спираль — клубок этоний вызывает также конформационный переход другого типа. Можно предположить, что им является переход ДНК в компактную форму. Действительно, гипохромизм ее поглощения, например в присутствии $4 \cdot 10^{-4}$ М Е, достигает 45 % (рис. 2). Такие же значения гипохромизма вблизи максимума поглощения (20—45 %) характерны для конденсированных структур одно- и мультицепочечных спиралей, образующихся в присутствии многовалентных ионов или в растворах, содержащих полиэтиленгликоль [8, 11—14]. Причиной гипохромизма в этом случае может быть «эффект тени» [11] или уменьшение расстояния между хромофорами [15]. Однако образующаяся в присутствии этония компактная форма, по-видимому, отличается от тороидальных частиц нДНК [11, 12]. Рассеяние света на них характеризуется значением $n \sim 2,5 \div 2,8$, что соответствует эффективному радиусу частиц $R_{эф} \sim 45\text{—}55 \text{ нм}$ [11]. В присутствии же этония величина $n=4 \pm 0,1$ (в диапазоне $(0,3\text{—}4) \cdot 10^{-4}$ М), что характерно для рассеяния света на частицах, величина $R_{эф}$ которых не превышает 1/40 длины рассеянного света [11], и, таким образом, соответствует $R_{эф} \sim 10 \text{ нм}$. Частицы такого размера обнаружены в одноцепочечной поли(А) в присутствии ионов кальция в условиях нейтрализации зарядов на фосфатах при взаимодействии с основаниями [13]. Можно предположить, что

в присутствии этония в компактную форму переходят также одноцепочечные расплавленные участки дДНК. Возможной причиной компактизации этих участков является образование дополнительных связей между основаниями ДНК и ее фосфатными группами, подобное наблюдаемому в компактной форме протонированной дДНК, обнаруженной Сухоруковым с соавт. [16], методом ИК-спектроскопии.

При $[E] \geq 5 \cdot 10^{-4}$ М этоний индуцирует образование агрегатов, способных к осаждению: величина n в этом случае уменьшается до двух, свидетельствуя о возрастании размеров рассеивающих частиц, а форма ДУФС (рис. 1, в) становится «зеркальным» отражением формы спектра

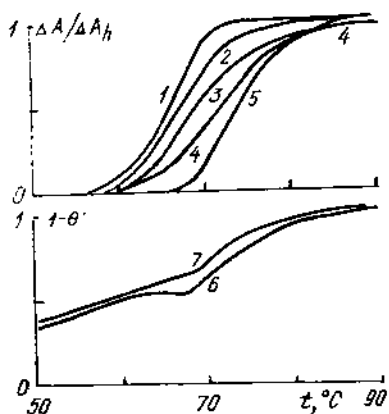
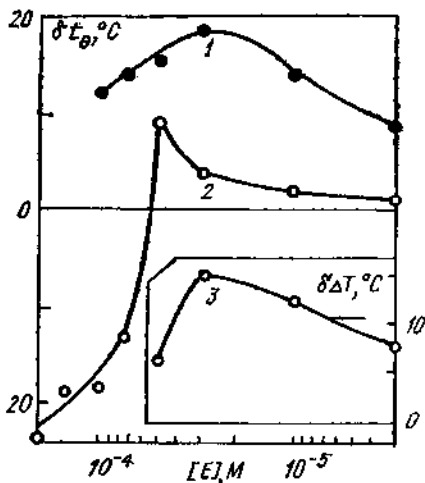


Рис. 4. Кривые плавления ДНК в присутствии этония: 1 — $[E] = 0$; 2 — $3 \cdot 10^{-6}$; 3 — 10^{-5} ; 4 — $3 \cdot 10^{-5}$; 5 — $5 \cdot 10^{-5}$; 6 — $7,5 \cdot 10^{-5}$; 7 — 10^{-4} М

Рис. 5. Фазовая диаграмма комплекса этония с ДНК ($\delta t_{\theta} = t_{\theta} - t_{\theta_0}$): 1 — $\delta t_{\theta=0} = \delta t_f$ ($t_f = 72$ °C); 2 — $\delta t_{\theta=1} = \delta t_s$ ($t_s = 58,4$ °C); 3 — изменение интервала плавления $\delta \Delta T = \delta t_f - \delta t_s$



УФ-поглощения ДНК: положение отрицательных минимума и максимума ДУФС совпадает с соответствующим положением экстремумов на УФ-спектре (38 500 и 43 500 см⁻¹).

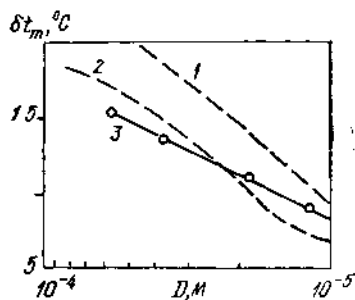
Форма полученных ДУФС (рис. 1) не позволяет выявить специфичности связывания этония с основаниями ДНК. Так, спектр 2 (рис. 1, в), индуцированный сдвигом полос поглощения дДНК при взаимодействии этония с гетероатомами оснований, близок по интенсивности и форме спектру 3, вызванному связыванием ионов двухвалентной меди с гуанином, аденином, цитозином и тиминном отдельных нуклеотидов [14]. Селективность этония по отношению к основаниям различной природы обнаруживается из данных по тепловой денатурации (рис. 4, 5).

Поскольку в этонии расстояние между бис-четвертичными азотами (~0,3 нм) сопоставимо с размерами большинства ионов двухвалентных металлов ($2R = 0,13 - 0,27$ нм; R — кристалло-химический радиус) [17], то можно было ожидать подобия влияния этих ионов и этония на параметры плавления ДНК. Действительно, как видно из рис. 4, 5, в присутствии малых концентраций этония наблюдаются повышение термостабильности, расширение интервала плавления и асимметрия кривых тепловой денатурации, т. е. все эффекты, характерные для плавления ДНК в присутствии ионов Me^{2+} .

Обнаруженное подобие позволяет предположить, что наблюдаемые эффекты обусловлены «скрепочным» механизмом [18] взаимодействия бис-четвертичных азотов этония с фосфатами ДНК. В соответствии с теорией [18], возрастание термостабильности полимера свидетельствует

о том, что константы связывания этония с фосфатами иДНК (K_2) выше, чем с фосфатами дДНК (K_1). Следствием этого является перераспределение в процессе разделения нитей полимера молекул этония с расплавленных на спиральные участки, сопровождающееся повышением термостабильности последних, что и приводит к расширению интервала перехода и появлению асимметрии на кривых плавления. Почти количественное согласие в изменении температуры плавления ДНК, вызванном этонием и ионами марганца (рис. 6), позволяет сделать вывод о том, что в изученных условиях отношение K_2/K_1 для этония, как и для ионов Mn^{2+} [14], составляет величину порядка 10.

Рис. 6. Концентрационная зависимость изменения температуры плавления ДНК в присутствии этония и ионов двухвалентных металлов (10^{-2} М Na^+ , pH 6): 1 — Mg^{2+} [10]; 2 — Mn^{2+} [19]; 3 — этоний. D — концентрация ионов. В случае этония $D = [E] + D_0$, где $D_0 = 9 \cdot 10^{-6}$ М — содержание примесных ионов в растворах ДНК, определенное по величине $\delta t_m = t_m - t_{m_0}$ [10, 14], где $t_{m_0} = 59^\circ C$ — температура плавления ДНК в присутствии инактивирующего примесные ионы Na_2 ЭДТА (10^{-4} М)



Как видно из рис. 5, возрастание температуры окончания плавления существенно больше, чем температуры его начала. Поскольку в природной ДНК величина t_f определяется стабильностью ГЦ-пар, а t_s — стабильностью АТ-пар, то, несмотря на неселективность связывания этония с фосфатами, т. е. на его независимость от природы нуклеотидов, в процессе разделения цепей перераспределение молекул этония приводит к преимущественной стабилизации ГЦ-пар. Таким образом, специфичность в изменении свойств нуклеотидов различной природы в присутствии этония может проявляться уже при очень малых концентрациях — порядка 10^{-6} М (рис. 5). Отметим, что декаметоксин не обладает такой особенностью, поскольку из-за большого расстояния между бис-четвертичными азотами ($\sim 1,5$ нм) его взаимодействие с фосфатами является очень слабым и не влияет на термостабильность ГЦ-пар [6].

Следовательно, одно из отличий этония от изученных ранее веществ неинтеркалирующей группы [1—6] заключается в том, что его стабилизирующее действие определяется в основном кулоновским взаимодействием близкорасположенных бис-четвертичных азотов с фосфатами, тогда как для других представителей этой группы (в том числе нетропсина [1]) оно в гораздо большей степени обусловлено специфическим взаимодействием их молекул с основаниями ДНК [1—4].

Изменение температуры плавления ДНК в присутствии магния (рис. 6) моделирует максимальное возрастание ее термостабильности, которое может дать кулоновское взаимодействие ионов двухвалентных металлов с фосфатами. Ионы переходных металлов взаимодействуют также с основаниями, понижая термостабильность ДНК, в результате чего эффект повышения ее температуры плавления в присутствии ионов переходных металлов всегда меньше, чем в присутствии ионов щелочно-земельных металлов [10, 14, 19]. В связи с этим корреляция в изменении t_m ДНК, вызванном марганцем и этонием (рис. 6), позволяет предположить наличие взаимодействия этония и с основаниями ДНК. Однако оно не повышает, как это характерно для связывания с основаниями других неинтеркаляторов [1—4], а понижает термостабильность полимера.

Превышение дестабилизирующего действия над стабилизирующим начинается при $[E] > (3-5) \cdot 10^{-5}$ М (рис. 5). В этой области концентраций изменение t_f и t_s с повышением содержания этония также различно. Так, при возрастании $[E]$ от $5 \cdot 10^{-5}$ до $7,5 \cdot 10^{-5}$ М t_f плавно

уменьшается всего на 2 °С, тогда как t_s — почти скачкообразно на 22 °С (рис. 5). Кроме того, при таком увеличении концентрации этония кардинальным образом меняется характер перехода спираль — клубок ДНК: при $[E] > 5 \cdot 10^{-5}$ М кривая плавления распадается на два независимых некооперативных участка, температура плавления которых отличается примерно на 25 °С (рис. 4). Можно предположить, что эти эффекты обусловлены преимущественным связыванием этония с АТ-парами и ДНК, стабильность которых при этом понижается. Таким образом, первый участок, вероятно, соответствует плавлению блоков, обогащенных АТ-парами, второй — ГЦ-парами. В согласии с этим предположением, окончание плавления первого участка при $7,5 \cdot 10^{-5}$ и 10^{-4} М достигается при величине $(1-\theta) = 0,52-0,63$ (рис. 4), что близко к содержанию АТ-пар в изученной ДНК ($[AT] \sim 0,58$).

Уменьшение термостабильности ДНК в присутствии этония может быть обусловлено как изменением ее структуры, так и более высоким сродством этония к основаниям разупорядоченных участков полимера. Последнее приведет к тому, что при разделении цепей молекулы будут переходить со спиральных участков, обогащенных АТ-парами, на расплавленные. При этом, поскольку связывание этония с основаниями понижает их термостабильность, его уход со спиральных участков вызовет увеличение температуры плавления АТ-пар. Следствием этого должно быть возрастание интервала плавления, что и наблюдается на кривых 6 и 7 (рис. 4).

Другая причина расширения интервала плавления состоит в возрастании различий в стабильности АТ- и ГЦ-пар. Последнее также является особенностью взаимодействия этония с ДНК по сравнению с изученными ранее веществами неинтеркалирующего типа [1—4]. Хотя для них (в частности, для олигопептидных антибиотиков нетропсина и дистамияцина А) также характерно преимущественное сродство к АТ-парам, оно приводит к уменьшению различия в термостабильности АТ- и ГЦ-пар и, как следствие, к возрастанию кооперативности плавления ДНК [1].

Отметим, что результаты, полученные для этония при концентрациях, превышающих $5 \cdot 10^{-5}$ М, подобны наблюдаемым в присутствии декаметоксина при содержании $10^{-4}-10^{-3}$ М.

В заключение можно отметить, что вопрос о том, определяется ли АТ-специфичность взаимодействия этония различием в значениях электростатического потенциала вблизи АТ- и ГЦ-пар, характерным именно для двухспиральной структуры [2], или различным сродством к гетероатомам оснований отдельных нуклеотидов независимо от их структурной организации в составе полимера, остается открытым. Ответ на него может быть получен при изучении модельных систем — отдельных мономеров и гомополинуклеотидов различной природы, находящихся в различной конформации.

В. А. Сорокин, В. А. Валев, Г. О. Гладченко, Ю. П. Благоев, Л. Ф. Суходуб

ВЗАЄМОДІЯ ПРОТИМІКРОБНОГО ПРЕПАРАТУ ЕТОНІЮ З ПРИРОДНОЮ ДНК

Резюме

Методами диференційної УФ-спектроскопії і термічної денатурації виявлено взаємодію антимікробного препарату етонію з природною ДНК. В області малих концентрацій ($\sim 10^{-6}-10^{-5}$ М) етоній підвищує її термостабільність за рахунок взаємодії біс-четвертинних азотів з фосфатами ДНК. Окрім того, етоній зв'язується з основами ДНК, спричиняючи формування одноланцюгових неупорядкованих ділянок та їх перехід до компактної форми, що являє собою частки з $R_{ef} \sim 10$ нм. Нуклеотидна селективність зв'язування етонію з основами иДНК проявляється у переважній де-стабілізації ним АТ-пар. При концентраціях етонію $(0,75-1) \cdot 10^{-4}$ М розбіжності у термостабільності АТ- і ГЦ-пар настільки великі, що перехід спіраль — клубок ДНК стає двофазним.

INTERACTION BETWEEN ANTIMICROBIC ETHONIUM DRUG AND NATURAL DNA

Summary

The interaction between the antimicrobial Ethonium drug and the natural DNA is revealed using the methods of differential UV spectroscopy and thermal denaturation. At low concentrations ($\sim 10^{-6}$ — 10^{-5} M) Ethonium increases thermal stability of DNA due to the interaction of bisquaternary nitrogens with the DNA phosphates. Besides, Ethonium is bound to the DNA bases, leading to the formation of single-chain disordered regions and their transition into a compact form consisting of particles with $R_{ef} \sim 100$ Å. The nucleotide selectivity of Ethonium binding to the *n*-DNA bases shows up as Ethonium-caused preferential destabilization of AT-pairs. At Ethonium concentrations $(0.75-1) \cdot 10^{-4}$ M the differences in thermostabilities of AT- and GC-pairs are so large that the helix-coil transition in DNA becomes a two-phase one.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zimmer Ch., Reinert K. E., Luck G. et al. Interaction of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin A with nucleic acids // *J. Mol. Biol.*—1971.—58, N 1.—P. 329—348.
2. Zakrzewska K., Lavery R., Pullman B. A theoretical study of the sequence specificity in binding of lexitropsins to B-DNA // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1987.—4, N 5.—P. 833—843.
3. Luck G., Reinert K. E., Baguley B., Zimmer Ch. Interaction of the nonintercalative antitumor drugs SN-6999 and SN-18071 with DNA: influence of ligand structure on the binding specificity // *Ibid.*—N 6.—P. 1079—1094.
4. Burckhardt G., Zimmer Ch., Baguley B. Binding of nonintercalative antitumor drugs to DNA polymers: structural effects of bisquaternary ammonium heterocycles // *Ibid.*—N 5.—P. 813—831.
5. Кухарь В. П., Сорокин В. А., Благой Ю. П., Суходуб Л. Ф. Наблюдение АТ-нуклеотидной специфичности при взаимодействии декаметоксина с природной ДНК // Докл. АН СССР.—1989.—305, № 4.—С. 997—999.
6. Сорокин В. А., Благой Ю. П., Валеев В. А. и др. Изучение комплексобразования ДНК с антимикробным препаратом декаметоксином // Молекуляр. биология.—1990.—24, № 1.—С. 214—219.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.*—1951.—193, N 12.—P. 268—275.
8. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Валеев В. А. Спектральное исследование связывания оснований ДНК с ионами магния и кальция // Молекуляр. биология.—1980.—14, № 3.—С. 595—605.
9. Сорокин В. А., Галкин В. Л., Валеев В. А. и др. Изучение энергетики гидратации компонентов нуклеиновых кислот методом дифференциальной УФ-спектроскопии // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 5.—С. 48—57.
10. Blagoi Yu. P., Sorokin V. A., Valeev V. A. et al. Magnesium ion effect on the helix-coil transition of DNA // *Biopolymers.*—1978.—17, N 5.—P. 1103—1118.
11. Евдокимов Ю. М., Акименко Н. М., Глухова Н. Е., Варшавский Я. М. Компактная форма ДНК в растворе. I. Особенности спектров поглощения полирибонуклеотидов и ДНК в водно-солевых растворах, содержащих полиэтиленгликоль // Молекуляр. биология.—1974.—8, № 3.—С. 396—405.
12. Thomas T. J., Bloomfield V. A. Collapse of DNA caused by trivalent cations: pH and ionic specificity effects // *Biopolymers.*—1983.—22, N 4.—P. 1097—1106.
13. Sorokin V. A., Blagoi Yu. P., Valeev V. A., Lisnyak Yu. V. Studies of calcium ion binding to poly A // *J. Inorg. Biochem.*—1983.—19.—P. 143—153.
14. Сорокин В. А. Металлокомплексы нуклеиновых кислот: Дис. ... док. физ.-мат. наук.—М., 1992.—387 с.
15. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия.—М.: Мир, 1984.—Т. 2.—493 с.
16. Сухорукое Б. И., Козлова Л. А., Шабарчина Л. И. Оптические свойства и молекулярное строение нуклеиновых кислот и их комплексов. V. Исследование инфракрасных спектров и молекулярного строения денатурированной ДНК при различном содержании воды и степени протонирования // Биофизика.—1975.—20, № 3.—С. 360—365.
17. Неорганическая биохимия / Под ред. Г. Эйхгорна.—М.: Мир, 1978.—Т. 1.—711 с.
18. Lazurkin Yu. S., Frank-Kamenetskii M. D., Trifonov E. N. Melting of DNA: its study and applications as a research method // *Biopolymers.*—1970.—9, N 6.—P. 1253—1306.
19. Blagoi Yu. P., Sorokin V. A., Valeev V. A., Gladchenko G. O. Calcium and manganese ion effect on helix-coil transition of DNA // *Ibid.*—1983.—22, N 7.—P. 1641—1656.