

УДК 577.323

**КОНКУРЕНЦИЯ ДВУХ ТИПОВ СВЯЗЫВАНИЯ АКРИХИНА С ДНК ПО  
ДАНЫМ ПОЛЯРИЗОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ****И.М. Волошин, О.А. Рязанова, В.Н. Зозуля***Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,  
пр. Ленина 47, 61103, Харьков, e-mail: voloshin@ilt.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 28 сентября 2011

Принята 31 октября 2011

Методами абсорбционной и поляризованной флуоресцентной спектроскопии исследовано связывание акридинового красителя акрихина (АХ) с ДНК из эритроцитов цыплят. Измерения проведены в водных буферных растворах (рН 6,9) при различных концентрациях красителя ( $[АХ] = 10^{-6} \div 10^{-4}$  М) и ионной силе растворов ( $[Na] = 10^{-3} \div 0,15$  М) в широком диапазоне соотношений молярных концентраций полимера и красителя (Р/Д). Установлено, что минимум на кривых флуоресцентного титрования, характеризующих зависимость интенсивности флуоресценции от Р/Д, обусловлен конкуренцией двух типов связывания АХ с ДНК, имеющих различные параметры высвечивания: (1) интеркаляционного, доминирующего при высоких Р/Д, и (2) внешнего электростатического, доминирующего при низких Р/Д, и сопровождающегося образованием нефлуоресцирующих ассоциатов красителя на сахарофосфатном остове ДНК. Определены абсорбционные и флуоресцентные характеристики этих комплексов. Приведена методика расчета вкладов различных типов связывания в комплексообразование в зависимости от Р/Д. Показано, что в случае электростатического взаимодействия размер места связывания в парах оснований ДНК, приходящихся на одну молекулу АХ, в 8 раз меньше, чем при интеркаляции, что позволяет внешнему связыванию успешно конкурировать с более сильным интеркаляционным типом взаимодействия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** акрихин, ДНК, внешнее связывание, интеркаляция, кооперативное связывание, флуоресценция, поглощение.

**КОНКУРЕНЦІЯ ДВОХ ТИПІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ АКРИХІНУ З ДНК  
ЗА ДАНИМИ ПОЛЯРИЗОВАНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ****І.М. Волошин О.О. Рязанова, В.М. Зозуля***Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,  
пр. Леніна 47, 61103, Харків, e-mail: voloshin@ilt.kharkov.ua*

Методами абсорбційної і поляризованої флуоресцентної спектроскопії досліджено зв'язування акридинового барвника акрихіну (АХ) з ДНК із еритроцитів курчат. Виміри виконано у водних буферних розчинах (рН 6,9) за умов різних концентрацій барвника ( $[АХ] = 10^{-6} \div 10^{-4}$  М) і іонної сили розчинів ( $[Na] = 10^{-3} \div 0.15$  М) у широкому діапазоні співвідношень молярних концентрацій фосфатів і барвника (Р/Д). Встановлено, що мінімум на кривих флуоресцентного титрування, які характеризують залежність інтенсивності флуоресценції від Р/Д, є обумовленим конкуренцією двох типів зв'язування АХ з ДНК, що мають різні параметри випромінювання: (1) інтеркаляційного, який є домінуючим при високих Р/Д, і (2) зовнішнього електростатичного, яке домінує при низьких Р/Д і супроводжується утворенням нефлуоресціюючих асоциатів барвника на цукровофосфатному хребті ДНК. Встановлено абсорбційні і флуоресцентні характеристики цих комплексів. Наведено методику розрахунку внесків різних типів зв'язування у комплексоутворення в залежності від Р/Д. Показано, що у випадку електростатичної взаємодії розмір місця зв'язування в парах основ ДНК, які припадають на одну молекулу АХ, є у 8 разів меншим, ніж при інтеркаляції, що дозволяє зовнішньому зв'язуванню успішно конкурувати з більш сильним інтеркаляційним типом взаємодії.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** акрихін, ДНК, зовнішнє зв'язування, інтеркаляція, кооперативне зв'язування, флуоресценція, поглинання.

**COMPETITION BETWEEN TWO QUINACRINE–DNA BINDING MODES  
FROM POLARIZED FLUORESCENCE DATA****I.M. Voloshin, O.A. Ryazanova, V.N. Zozulya***B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of NAS of Ukraine,  
47 Lenin ave., 61103, Kharkiv, e-mail: voloshin@ilt.kharkov.ua*

Binding of acridine derivative quinacrine (QA) to chicken erythrocyte DNA was studied by methods of absorption and polarized fluorescent spectroscopy. Measurements were carried out in aqueous buffered solutions (pH 6.9) of different dye concentrations ( $[QA] = 10^{-6} \div 10^{-4}$  M) and ionic strengths ( $[Na^+] = 10^{-3} \div 0.15$  M) in a wide range of phosphate-to-dye molar ratios (P/D). It is established that the minimum of fluorescent titration curve plotted as relative fluorescence intensity vs P/D is conditioned by the competition between the two types of QA binding to DNA which possess by different emission parameters: (i) intercalative one dominating under high P/D values, and (ii) outside electrostatic binding dominating under low P/D values, which is accompanied by the formation of non-fluorescent dye associates on the DNA backbone. Absorption and fluorescent characteristics of complexes formed were determined. The method of calculation of different binding modes contribution to the complex formation depending on P/D value is presented. It was shown that the size of binding site measured as the number of DNA base pairs per one QA molecule bound in the case of the electrostatic interaction is 8 times less than that for the intercalative one, that determines the competitive ability of the outside binding against the stronger intercalative binding mode.

**KEY WORDS:** quinacrine, DNA, outside binding, intercalation, cooperative binding, fluorescence, absorption.

Изучение взаимодействия органических красителей с биополимерами является одним из основных научных подходов, позволяющих получить информацию о молекулярных механизмах функционирования различных биологических систем. В частности, красители дают возможность визуализации внутриклеточных структур. Так, благодаря работам Касперсона с соавторами [1-3] по окрашиванию фиксированных хромосом, широкое применение в цитологии получило акридиновое производное акрихин (quinacrine, teracrine, atabrine – Рис. 1), обладающее интенсивной желто-зеленой флуоресценцией и позволяющее получить специфическую картину окрашивания (характерные поперечные полосы на хромосомах), что было успешно использовано при хромосомном анализе. Высокая биологическая активность акрихина обуславливает широкий спектр его применения в биологии и медицине в качестве антипротозойного, антиревматического, антигельминтного агента. Акрихин был впервые синтезирован фирмой Bayer (Германия) в 1931 году. Во время Второй мировой войны его широко использовали для профилактики и лечения малярии. Также акрихин применяют при лечении лямблиоза, тенидоза, дифиллоботриоза, лейшманиоза, красной волчанки и др. [4,5]. Показано, что при связывании с прионными белками акрихин блокирует их трансформацию в болезнетворную форму, что делает весьма перспективным его использование при разработке препаратов от прионных энцефалопатий [6]. Столь широкий спектр действия данного соединения вызывает большой научный интерес и необходимость выяснения молекулярных механизмов комплексообразования акрихина с биополимерами и учета особенностей формируемых структур. Поскольку акрихин обладает плоской ароматической трициклической структурой и является дикатионом, наибольший интерес представляет его взаимодействие с такими ионогенными биополимерами, как нуклеиновые кислоты (НК) и белки. Являясь ключевыми участниками биологических процессов, данные биополимеры могут претерпевать при комплексообразовании различные структурные изменения, которые в той или иной степени влияют на их функционирование. Так, например, для ДНК взаимодействие с производными акридина приводит к смещению рамок считывания, фоторазрезанию и другим эффектам [7-10].

Известно, что при взаимодействии акридиновых производных с ДНК помимо сильного интеркаляционного типа связывания также наблюдается более слабое

внешнее связывание, обусловленное электростатическим взаимодействием положительно заряженного хромофора с полианионным сахарофосфатным остовом двойной спирали [11,12], вклад которого в формирование структуры комплексов может быть существенным даже при физиологической ионной силе растворов и высоких соотношениях молярных концентраций фосфатов ДНК и красителя (P/D) [13,14].

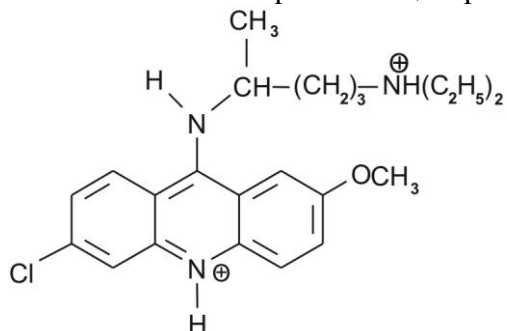


Рис. 1. Структурная формула акрихина (АХ).

интеркаляционного связывания акридинов с НК при высоких соотношениях P/D [15]. Изучением вклада внешнего связывания пренебрегали, считая его несущественным при физиологических ионных условиях. Это могло приводить к появлению ошибки при оценке кооперативности процесса связывания, специфичности мест связывания и их размера. Наличие внешнего связывания также необходимо учитывать при использовании флуоресцентных меток для изучения внутриклеточных процессов.

Одним из методов, позволяющих оценить вклады различных типов связывания красителей с НК, является поляризованная флуоресцентная спектроскопия, весьма чувствительная к изменению окружения и подвижности хромофоров. Данные по измерению степени поляризации флуоресценции красителей при их комплексообразовании с НК весьма малочисленны. В частности, отсутствуют данные об изменении поляризации флуоресценции АХ при его связывании с ДНК в широком диапазоне концентраций, различных значениях ионной силы растворов и P/D.

В данной работе методом абсорбционной и поляризованной флуоресцентной спектроскопии проведено исследование связывания АХ с ДНК в широком диапазоне P/D при различных концентрациях красителя ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М) и ионной силы растворов (0,0012, 0,01 и 0,15 М Na<sup>+</sup>). Дана количественная оценка вкладов интеркаляционного и внешнего связывания в зависимости от условий эксперимента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали дигидрохлорид акрихина (АХ, Рис. 1) (quinacrine dihydrochloride) производства Serva (Гейдельберг, Германия) и натриевую соль высокополимерной ДНК из эритроцитов цыплят (с содержанием 41% GC-пар) производства Reanal (Венгрия).

В качестве растворителя во всех экспериментах использовали 0,001 М Na-какодилатный буфер (pH 6,9), содержащий 0,0001 М Na<sub>2</sub>ЭДТА, приготовленный на деионизованной дистиллированной воде, в который добавляли NaCl (Sigma Chemical Co.), для получения концентраций 0,01 и 0,15 М Na<sup>+</sup>. Буферные растворы были профильтрованы через нитроцеллюлозные фильтры (Millipore, США) с диаметром пор 0,22 мкм.

Концентрацию красителя и ДНК определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты молярной экстинкции:  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для ДНК и  $\epsilon_{424} = 9750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для АХ [16]. Образцы для спектральных измерений получали

Однако, несмотря на множество работ, посвященных изучению взаимодействия органических красителей с нуклеиновыми кислотами, в настоящее время не имеется достоверных данных о количественном соотношении вкладов данных типов связывания, что обусловлено, в частности, малочисленностью эффективных методов для их разделения. Анализ имеющейся литературы показывает, что внимание, главным образом, уделялось изучению

смешиванием в заданных объёмных пропорциях базовых растворов известной концентрации.

Электронные спектры поглощения были зарегистрированы в 1 см кварцевой кювете на спектрофотометре SPECORD UV-VIS (Carl Zeiss, Йена, Германия). Интенсивность и поляризацию флуоресценции измеряли в той же кювете методом счета фотонов на лабораторном спектрофлуориметре на основе двойного монохроматора ДФС-12 (ЛОМО, Россия). Возбуждение флуоресценции осуществляли непрерывным плоскополяризованным излучением He-Cd лазера ЛПМ-11 ( $\lambda = 441,6$  нм), мощность которого в течение эксперимента стабилизировали, используя устройство, описанное в работе [17]. Излучение регистрировали под углом  $90^\circ$  к возбуждающему лучу. Счет фотонов производился путем накопления импульсов за 10 с для каждой экспериментальной точки. Также была внесена поправка на поглощение лазерного луча в слое раствора от входной стенки до центра кюветы. Установка и методика измерений были описаны ранее [18]. Полную интенсивность ( $I$ ), степень поляризации ( $p$ ) и анизотропию флуоресценции ( $\mu$ ) определяли по формулам [19]:

$$I = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \quad (1)$$

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (2)$$

$$\mu = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I} = \frac{2p}{3 - p} \quad (3)$$

где  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  - параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции.

Связывание красителя с ДНК было изучено методом флуоресцентного титрования при нескольких заданных значениях концентраций АХ, находящихся в диапазоне  $10^{-6} \div 10^{-4}$  М. При этом в раствор АХ добавляли комплекс АХ с ДНК, содержащий такую же концентрацию красителя, что позволяло получить необходимое соотношение молярных концентраций фосфатов ДНК и красителя без изменения концентрации красителя в комплексе. В ходе эксперимента регистрировали интенсивность и степень поляризации флуоресценции комплекса при длине волны, соответствующей максимуму излучения свободного АХ ( $\lambda = 510$  нм). Измерения выполнены при комнатной температуре 22-24 °С.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На Рис. 2 представлены электронные спектры поглощения и флуоресценции АХ в свободном и связанном с ДНК состояниях. Из рисунка видно, что спектр поглощения свободного красителя представляет собой суперпозицию интенсивных полос с максимумами при 424 и 445 нм, и менее интенсивного коротковолнового плеча, а спектр флуоресценции – широкую интенсивную бесструктурную полосу с максимумом при 510 нм. Степень поляризации флуоресценции,  $p$ , равна 0,035.

На Рис. 3(а,б) приведены кривые флуоресцентного титрования раствора АХ его комплексом с нативной ДНК, построенные в виде зависимости относительной интенсивности,  $I/I_0$  (Рис. 3а), и степени поляризации флуоресценции,  $p$  (Рис. 3б), от  $P/D$ , где  $I_0$  – интенсивность флуоресценции свободного красителя, а  $I$  – его комплекса с ДНК, измеренные при  $\lambda = 510$  нм. Кривые наглядно иллюстрируют зависимость связывания АХ с ДНК при низкой концентрации красителя ( $C_{\text{АХ}} = 10^{-6}$  М) от ионной силы раствора. Из

рисунков видно, что при связывании происходит сильное изменение абсорбционных и флуоресцентных характеристик АХ. Наиболее сильно оно проявляется в диапазоне  $0 < P/D < 30$ , где можно выделить несколько интервалов. Так, при низкой ионной силе раствора,  $[Na^+] = 0,0012 \text{ M}$ , начальный участок кривой титрования ( $P/D = 0 \div 4$ ) имеет линейный вид, характерный для внешнего кооперативного электростатического связывания катионного красителя с полианионными матрицами [20-22].

Увеличение ионной силы раствора ослабляет связывание красителя с ДНК вследствие

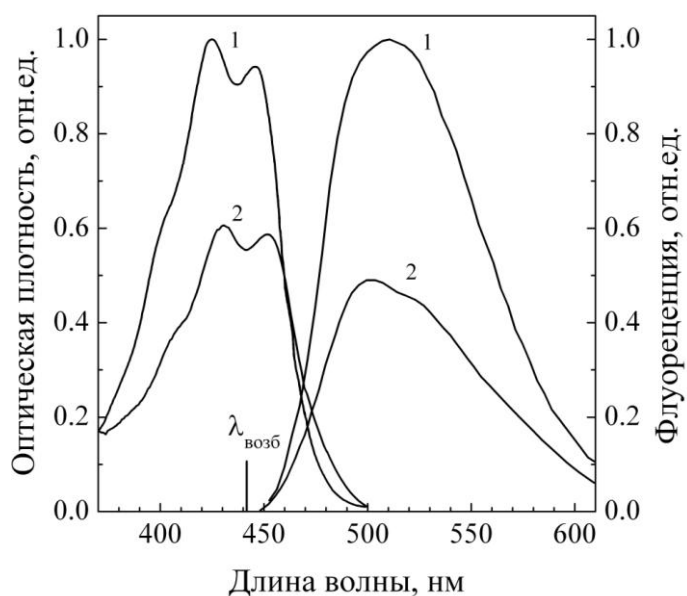


Рис. 2. Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) акрихина (1) и его комплекса с ДНК при  $P/D = 100$  (2) в водном буферном растворе, нормированные на величину поглощения и флуоресценции свободного АХ в максимуме. Измерения выполнены при  $20^\circ\text{C}$ .

зарегистрированные при высокой и низкой ионной силе раствора и более высокой концентрации красителя,  $C_{\text{АХ}} = 10^{-4} \text{ M}$ . По сравнению с предыдущей системой ( $C_{\text{АХ}} = 10^{-6} \text{ M}$ , Рис. 3а) наблюдается более сильное тушение флуоресценции: в минимуме кривой, при  $P/D = 4$ , высвечивание составляет только 9% от  $I_0$ . Это объясняется тем, что доля связанного внешним образом красителя пропорциональна его концентрации.

Более наглядно зависимость связывания красителя от его концентрации продемонстрирована на Рис. 5, где приведены кривые флуоресцентного титрования АХ–ДНК, зарегистрированные при низкой ионной силе и  $C_{\text{АХ}} = 10^{-6}$ ;  $2 \cdot 10^{-5}$ ;  $10^{-4} \text{ M}$ . Из рисунка видно, что рост концентрации акрихина приводит к заметному усилению тушения его флуоресценции, что проявляется в углублении минимума кривой титрования. Однако, практически полного тушения флуоресценции, как в случае системы АХ–неорганический полифосфат (пунктирная линия на Рис. 5 [27]), для которой характерно только внешнее кооперативное связывание, не происходит, поскольку, даже при  $P/D = 4$  вклад интеркаляции не равен нулю.

Разделить вклады внешнего и интеркаляционного связывания в комплексообразование АХ с ДНК, а также определить доли свободных и связанных молекул красителя в растворе позволили одновременные измерения интенсивности и анизотропии флуоресценции комплексов, поскольку эти параметры различны.

конкуренции между АХ и ионами натрия, что приводит к уменьшению глубины минимума на кривой титрования при  $[Na^+] = 0,01 \text{ M}$  ( $I/I_0 = 30\%$ ) и его полному исчезновению при физиологической ионной силе раствора  $[Na^+] = 0,15 \text{ M}$ . Степень поляризации флуоресценции при этом растет значительно медленнее, чем в растворах с низкой ионной силой (Рис. 3б), что свидетельствует о негативном влиянии ионов натрия не только на внешнее, но и на интеркаляционное связывание. Однако по достижении  $P/D \approx 200$  для  $[Na^+] = 0,01 \text{ M}$ , и  $P/D \approx 1000$  для  $[Na^+] = 0,15 \text{ M}$  она также выходит на уровень  $p = 0,3$  (не приведено).

На Рис. 4 приведены кривые флуоресцентного титрования,

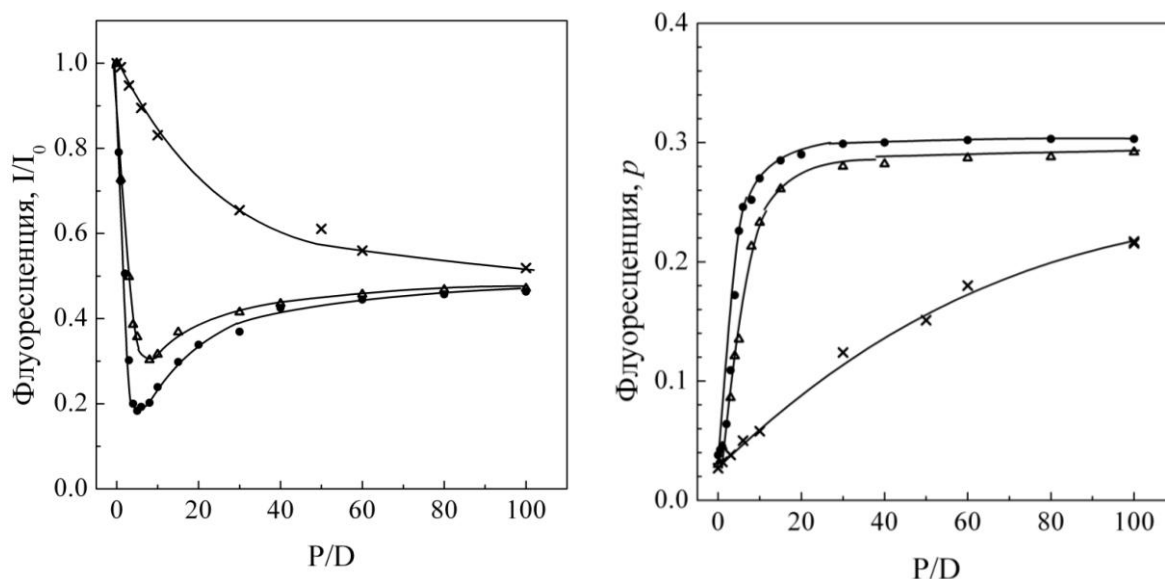


Рис. 3. Зависимость нормированной интенсивности (слева) и степени поляризации (справа) флуоресценции акрихина ( $C_{AX} = 10^{-6}$  М,  $\lambda_{возб} = 441,6$  нм,  $\lambda_{набл} = 510$  нм) от соотношения молярных концентраций полимер/краситель при титровании ДНК, полученная в растворах различной ионной силы: (•) – 0,0012 М  $Na^+$ , ( $\Delta$ ) – 0,01 М  $Na^+$ , ( $\times$ ) – 0,15 М  $Na^+$ .

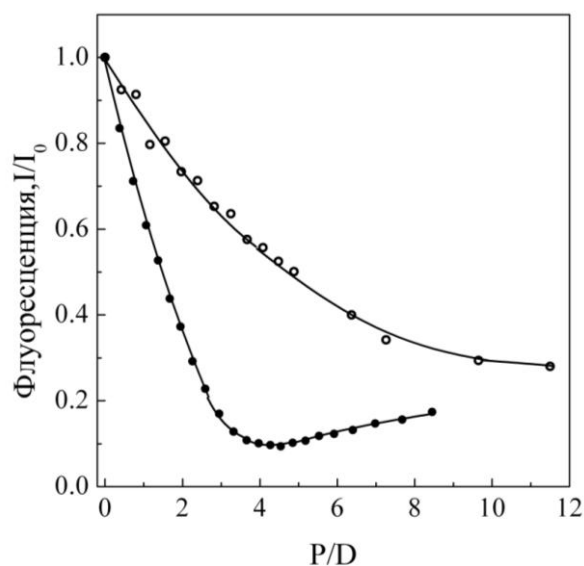


Рис. 4. Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции акрихина ( $C_{AX} = 10^{-4}$  М,  $\lambda_{возб} = 441,6$  нм,  $\lambda_{набл} = 510$  нм) от P/D при титровании ДНК, полученная в растворах различной ионной силы: (•) – 0,0012 М  $Na^+$ , (○) – 0,1 М  $Na^+$ .

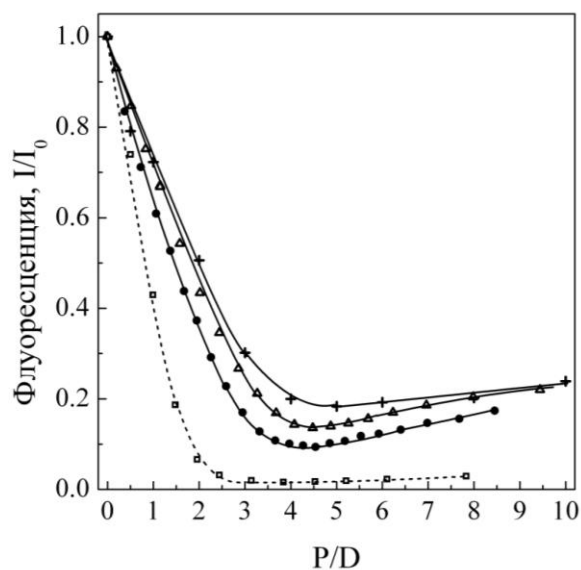


Рис. 5. Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции акрихина ( $\lambda_{возб} = 441,6$  нм,  $\lambda_{набл} = 510$  нм), от соотношения P/D при титровании ДНК, полученная при различных концентрациях AX: (•) –  $10^{-4}$  М, ( $\Delta$ ) –  $2 \cdot 10^{-5}$  М, (+) –  $10^{-6}$  М, в растворе, содержащем 0,0012 М  $Na^+$ . Пунктиром обозначена зависимость для комплекса AX – неорганический полифосфат ( $C_{AX} = 5 \cdot 10^{-5}$  М).

Для этого использовали систему уравнений [28,29]:

$$\begin{cases} \sum_{i=0}^2 \mu_i I_i f_i = \mu I & (4) \\ \sum_{i=0}^2 I_i f_i = I & (5) \\ \sum_{i=0}^2 f_i = 1, & (6) \end{cases}$$

где  $f_i$  - доля,  $I_i$  - интенсивность и  $\mu_i$  - анизотропия флуоресценции красителя в  $i$ -состоянии, при этом  $i = 0$  соответствует свободному,  $i = 1$  – интеркалированному в ДНК и  $i = 2$  – внешним образом связанному красителю. Полученные данные были построены в виде зависимостей  $f_i$  от  $P/D$  (Рис. 6). Приведенные на Рис. 6 кривые, рассчитанные для растворов АХ–ДНК, содержащих  $2 \cdot 10^{-5}$  М красителя и  $0,0012$  М  $\text{Na}^+$ , наглядно иллюстрируют вклады двух типов связывания АХ с ДНК при различных соотношениях красителя и полимера в растворе. Так, при высоких значениях  $P/D$  преобладает интеркаляционный механизм связывания, тогда как при низких доминирует внешнее связывание. При уменьшении  $P/D$  наблюдается уменьшение плотности заселения мест интеркаляционного типа, т.е. происходит перераспределение молекул красителя между двумя связанными состояниями в пользу внешнего связывания. Например, при  $P/D = 50$  интеркалировано около 91,2 % акрихина, во внешнем связывании задействовано 8,3 % и

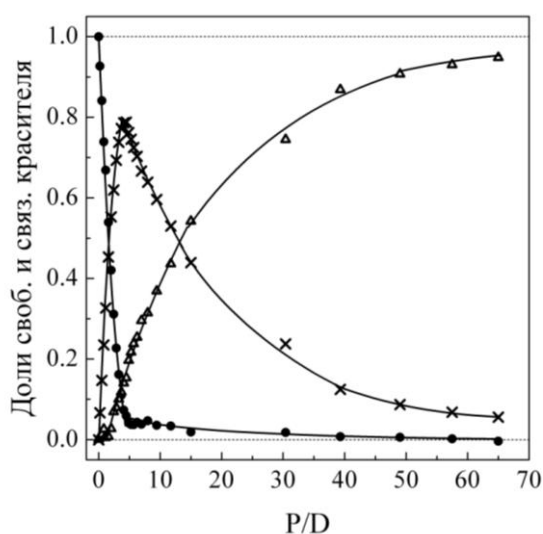


Рис. 6. Соотношение долей свободного (○) и связанного с ДНК акрихина: (△) – интеркаляция, (×) – внешнее связывание. Данные рассчитаны для комплексов АХ–ДНК ( $C_{\text{АХ}} = 2 \cdot 10^{-5}$  М) в растворе, содержащем  $0,0012$  М  $\text{Na}^+$ .

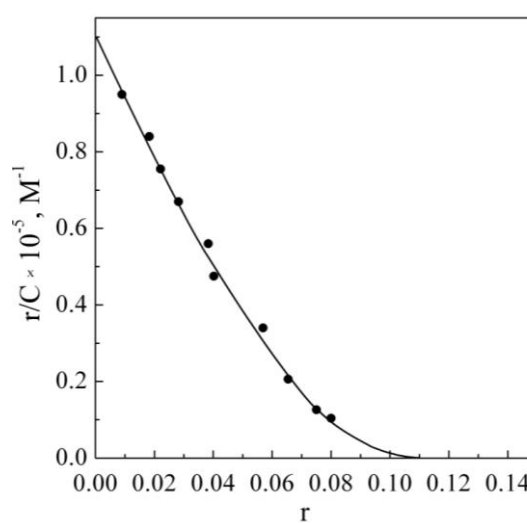


Рис. 7. График Скэтчарда для акрихина, связанного с ДНК в растворе, содержащем  $0,15$  М  $\text{Na}^+$ ,  $C_{\text{АХ}} = 10^{-6}$  М. Сплошной линией показана расчетная кривая, полученная из уравнения МакГи и фон Хиппела (7) при  $K = 1,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  и  $m = 8$ .

только 0,5 % не участвует в комплексообразовании. В минимуме кривой титрования при  $P/D = 4$  большая часть красителя (78,5 %) входит в состав комплексов 2 типа (внешнее связывание), и только 14 % молекул интеркалировано в двойную спираль (в свободном состоянии находится 7,5 % красителя).

Параметры интеркаляционного типа связывания АХ с ДНК были определены из графика Скэтчарда (Рис. 7), построенного по данным, полученным при низкой концентрации красителя,  $[\text{АХ}] = 10^{-6}$  М, в растворе, содержащем  $0,15$  М  $\text{Na}^+$ , когда внешним связыванием можно пренебречь. Этот тип связывания характеризуется

нелинейной изотермой адсорбции, которая хорошо описывается теоретической зависимостью, полученной для некооперативного связывания лигандов на гомополимере [30]:

$$\frac{r}{C} = K \frac{(1 - mr)^m}{[1 - (m - 1)r]^{m-1}} \quad (7),$$

где  $K$  – кажущаяся константа связывания,  $m$  – размер места связывания, равный количеству нуклеотидных пар, приходящихся на одну молекулу красителя,  $r$  – количество связанных молекул красителя, приходящееся на нуклеотидную пару,  $C$  – концентрация свободного красителя. Наилучшая аппроксимация экспериментальных точек получается при значениях параметров в уравнении (7)  $m = 8$ ,  $K = 1,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  (Рис. 7). Полученные результаты показывают, что насыщение интеркаляционного связывания наступает при одной молекуле красителя, приходящейся на 8 пар оснований. Полученное значение  $m$  хорошо согласуется с данными [31]. При понижении ионной силы раствора до  $[\text{Na}^+] = 0,0012 \text{ M}$  константа интеркаляционного связывания возрастает до значения  $K \sim 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  [16].

Внешнее электростатическое связывание характеризуется большей плотностью мест посадки на полианионе, т.е. меньшим размером мест связывания,  $m = 1$ . Однако, его константа связывания на три порядка меньше, чем для интеркаляции. Так, например, в случае моделирования электростатического связывания АХ с НК системой АХ – неорганический полифосфат при  $[\text{Na}^+] = 0,0012 \text{ M}$  было получено  $K = 1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  [27]. Упомянутый выше переход красителя из интеркалированного состояние во внешне связанное можно объяснить исходя из теории МакГи и фон Хиппела [30,32], а именно, при насыщении связывания общий прирост свободной энергии может быть большим в случае менее сильного взаимодействия за счёт более высокой плотности мест посадки на полимере.

## ВЫВОДЫ

Связывание АХ с ДНК осуществляется посредством двух механизмов: интеркаляции красителя между парами оснований и внешнего электростатического взаимодействия с полианионной матрицей ДНК, сопровождающегося стэкингом его хромофоров. Одновременные измерения интенсивности и степени поляризации флуоресценции позволяют не только определить доли свободных и связанных молекул красителя, но и количественно разделить вклады двух состояний связанного красителя. Установлено наличие конкуренции между двумя типами связывания АХ с ДНК. Показано, что в случае внешнего взаимодействия размер места связывания (в парах оснований ДНК на одну молекулу АХ) в 8 раз меньше, чем при интеркаляции, что позволяет внешнему связыванию успешно конкурировать с более сильным интеркаляционным типом взаимодействия. При насыщении связывания внешнее комплексообразование может доминировать.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caspersson, T. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes / T. Caspersson, L. Zech, E.J. Modest, [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 1969. – V. 58(1). – P. 128–140.
2. Caspersson, T. DNA binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus / T. Caspersson, L. Zech, E.J. Modest, [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 1969. – V. 58(1). – P. 141–152.
3. Caspersson, T. Chemical differentiation along metaphase chromosomes / T. Caspersson, L. Zech, C. Johansson, E.J. Modest // *Chromosoma*. – 1970. – V. 30(2). – P. 215–227.
4. Goodman, L.S. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 5<sup>th</sup> ed. / L.S. Goodman, A. Gilman. - New York: Macmillan, 1975. – P. 1030–1032.
5. Wallace, D.J. The use of quinacrine (Atabrine) in rheumatic diseases: a reexamination / D.J. Wallace // *Semin. Arthritis Rheum.* – 1989. – V. 18. – P. 282–297.
6. Doh-ura, K. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models / K. Doh-ura, K. Ishikawa, I. Murakami-Kubo, [et al.] // *J. Virol.* – 2004. – V. 78. – P. 4999–5006.
7. Ferguson, L.R. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators / L.R. Ferguson, W.A. Denny //



- Mutat. Res. – 2007. – V. 623(1-2). – P. 14-23.
8. Krzyminski, K. Spectral properties of substituted 9-(phenoxy-carbonyl)-acridines and related cations: experimental and theoretical investigations / K. Krzyminski, A.D. Roshal, A. Niziolek // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2008. – V. 70(2). – P. 394–402.
  9. Valencia, C. Quantum yields of singlet molecular oxygen,  $O_2(^1\Delta_g)$ , produced by antimalaric drugs in organic solvents / C. Valencia, E. Lemp, A.L. Zanocco // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2003. – V. 48(4). – P. 17–21.
  10. Di Giorgio, C. DNA-damaging activity and mutagenicity of 16 newly synthesized thiazolo[5,4-a]acridine derivatives with high photo-inducible cytotoxicity / C. Di Giorgio, A. Nikoyan, L. Decome, [et al.] // *Mutat. Res.* – 2008. – V. 650(2). – P. 104–114.
  11. Porumb, H. The solution spectroscopy of drugs and the drug – nucleic acid interactions / H. Porumb // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* – 1978. – V. 37. – P. 175–195.
  12. Berman, H.M. The interaction of intercalating drugs with nucleic acids / H.M. Berman, P.R. Young // *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* – 1981. – V. 10. – P. 87–114.
  13. Li, H.J. Relaxation studies of the proflavine-DNA complex: the kinetics of an intercalation reaction / H.J. Li, D.M. Crothers // *J. Mol. Biol.* – 1969. – V. 39. – P. 461–477.
  14. Schmechle, D.E.V. Kinetic and hydrodynamic studies of the complex of proflavine with polyA-polyU / D.E.V. Schmechle, D.M. Crothers // *Biopolymers.* – 1971. – V. 10(3). – P. 465–480.
  15. Nakamoto, K. Drug-DNA interactions: structures and spectra. V. 51 / K. Nakamoto, M. Tsuboi, G.D. Strahan - John Wiley & Sons, 2008. - 370 p.
  16. Wilson, W.D. Analysis of cooperativity and ion effects in the interaction of quinacrine with DNA / W.D. Wilson, J.G. Lopp // *Biopolymers.* – 1979. – V. 18(12). – P. 3025–3041.
  17. Говор, И.Н. Стабилизатор мощности излучения ОКГ / И.Н. Говор, В.М. Нестеренко // *Приборы и техника эксперимента.* – 1974. – № 3. – С. 168–169.
  18. Zozulya, V. Fluorescence and binding properties of phenazine derivatives in complexes with polynucleotides of various base composition and secondary structure / V. Zozulya, Yu. Blagoi, G. Lober, I. Voloshin, [et al.] // *Biophys. Chem.* – 1997 – V. 65. - P. 55-63.
  19. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescent Spectroscopy 2<sup>nd</sup> ed. / J.R. Lakowicz - Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999. – 362 p.
  20. Schwarz, G. Thermodynamic and kinetic studies on the cooperative binding of proflavine to linear polyanions / G. Schwarz, S. Klose // *Eur. J. Biochem.* – 1972. – V. 29. – P. 249–256.
  21. Balcarova, Z. Interaction of phenosafranine with nucleic acids and model polyphosphates. I. Self-aggregation and complex formation with inorganic polyphosphates / Z. Balcarova, V. Kleinwachter; J. Koudelka, [et al.] // *Biophys. Chem.* – 1978. – V. 8. – P. 17–25.
  22. Zozulya, V.N. Cooperative binding of daunomycin and carminomycin to inorganic polyphosphate / V.N. Zozulya, V.F. Fyodorov, Yu.P. Blagoi // *Stud. Biophys.* – 1990. – V. 137 (1-2). – P. 17–28.
  23. Pachman, U. Quantum yield of acridines interacting with DNA of defined base sequence. A basis for the explanation of acridine bands in chromosomes / U. Pachman, R. Rigler // *Exper. Cell. Res.* – 1972. – V. 72(2). – P. 602–608.
  24. Borisova, O.F. Evidence for quinacrine fluorescence on three AT pairs of DNA / O.F. Borisova, A.P. Razjivin, V.I. Zaregorodsev // *FEBS Letters.* – 1974. – V. 46. – P. 239–242.
  25. Baldini, G. Fluorescence analysis of GC versus AT binding of quinacrine to DNA / G. Baldini, S. Doglia, G. Sassi, G. Lucchini // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1981. – V. 3. – P. 248–252.
  26. Sheina, G.G. Studies of cationic and neutral form of acridine compound interaction with nucleic acids / G.G. Sheina, A.P. Limansky, T.F. Stepanova, Yu.P. Blagoi // *Stud. biophys.* – 1984. – V. 100(3). – P. 187–194.
  27. Zozulya, V.N. Cooperative binding of quinacrine to inorganic polyphosphate / V.N. Zozulya, I.M. Voloshin // *Biophys. Chem.* – 1994. – V. 48. – P. 353–358.
  28. Deranleau, D.A. Estimation of the saturation fraction of bound fluorescent ligands from intensity and anisotropy of the emission / D.A. Deranleau, Th. Binkert, P. Bally // *J. Theor. Biol.* – 1980. – V.86. – P. 477–485.
  29. Weber, G. Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. Theory and experimental method / G. Weber // *Biochem. J.* – 1952. – V. 51. – P. 145–155.
  30. McGhee, J.D. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Cooperative and noncooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice / J.D. McGhee, P.H. Von Hippel // *J. Mol. Biol.* – 1974. – V. 86. – P. 469–489.
  31. Aslanoglu, M. Voltammetric studies of the interaction of quinacrine with DNA / M. Aslanoglu, G. Ayne // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. – V. 380(4). – P. 658–663.
  32. Gaugain, B. DNA bifunctional intercalators. 2. Fluorescence properties and DNA binding interaction of an ethidium homodimer and acridine ethidium heterodimer / B. Gaugain, J. Barbert, N. Capelle, [et al.] // *Biochemistry.* – 1978. – V.17 (24). – P. 5078–5088.