

ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Множественность "возвратных" холестерических структур в жидкокристаллических дисперсиях ДНК

Ю.М. Евдокимов, С.Г. Скуридин, В.И. Салянов, С.В. Семёнов, Е.И. Кац

Систематизированы результаты исследований свойств дисперсий ДНК, формируемых при фазовом исключении этих молекул. В рамках представления о существовании "квазинематических" слоёв из ориентационно упорядоченных молекул ДНК в частицах дисперсий выяснено влияние температуры и осмотического давления на их структуру. Обнаруженный авторами новый фазовый переход гексагональная → "возвратная" холестерическая упаковка молекул ДНК описан с учётом обобщённого критерия Линдемана. Множественность "возвратных" фаз и их структура зависят от характеристик ДНК и водно-полимерного раствора.

Ключевые слова: ДНК, жидкокристаллические дисперсии, круговой дихроизм, текстуры, интеркаляторы, "возвратные" фазы, критерий Линдемана

PACS numbers: 61.30.Eb, 64.70.M–, 82.70.–y

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2020.09.038843>

Содержание

1. Введение (999).
 2. Образование и свойства частиц дисперсии ДНК при комнатной температуре (1000).
 3. Гексагональная упаковка молекул ДНК в частицах дисперсии (1001).
 4. Холестерическая упаковка молекул ДНК в частицах дисперсии (1001).
 5. Спектры кругового дихроизма дисперсий ДНК (1002).
 6. Частицы жидкокристаллических дисперсий ДНК, образующиеся при повышенной температуре (1006).
 7. Интеркаляция антибиотиков между парами оснований ДНК в частицах дисперсий с разной упаковкой молекул (1008).
 8. "Возвратные" холестерические структуры ДНК и критерий Линдемана (1011).
 9. Заключение (1014).
- Список литературы (1014).

Посвящается памяти О.Н. Компанца — создателя портативных дихрометров, с помощью которых были получены новые экспериментальные данные

1. Введение

Упаковка двуцепочечных (ДЦ) молекул ДНК в жидкокристаллических (ЖК) фазах и жидкокристаллических дисперсиях (ЖКД) по-прежнему остаётся в фокусе многих экспериментальных и теоретических работ.

Начиная с 1961 г. известно, что растворение образца лиофилизированного препарата ДНК (высокой молекулярной массы) и изменение её концентрации с помощью буферного раствора сопровождаются сближением соседних молекул и формированием конденсированных фаз. Исторически первыми из таких фаз были холестерические [1] и гексагональные фазы [2–7].

Альтернативный метод приготовления фаз ДНК состоит в увеличении концентрации ДНК за счёт ультрафильтрации раствора через мембрану, размер пор которой позволяет проходить через неё молекулам воды и ионам солей, но не молекулам ДЦ ДНК [8, 9]. Фазы ДЦ ДНК, полученные при увеличении её концентрации в водно-солевых растворах, представляют собой, по существу, вязкие растворы, в которых соседние молекулы ДНК являются ориентационно упорядоченными и сохраняют способность скользить относительно друг друга.

Проблеме упаковки ДЦ-молекул ДНК в фазах, сформированных при разной концентрации, посвящено большое число специализированных обзоров и экспериментальных работ [10–14]. Упаковка ДЦ-молекул ДНК в фазах исследована с помощью электронной (и криоэлектронной) микроскопии, а также поляризационной микроскопии тонких слоёв этих фаз [15–17]. Для определения расстояния между ДЦ-молекулами ДНК в сформирован-

Ю.М. Евдокимов^(1,a), С.Г. Скуридин⁽¹⁾, В.И. Салянов⁽¹⁾, С.В. Семёнов⁽²⁾, Е.И. Кац⁽³⁾

⁽¹⁾ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова 32, 119991 Москва, Российская Федерация

⁽²⁾ Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", пл. Академика Курчатова 1, 123182 Москва, Российская Федерация

⁽³⁾ Институт теоретической физики им. Л.Д. Ландау РАН, просп. Академика Семёнова 1, 142432 Черноголовка, Московская область, Российская Федерация

E-mail: ^(a) yevdokim@eimb.ru

Статья поступила 23 июня 2020 г.,
после доработки 22 июля 2020 г.

ных фазах использовался метод рентгеноструктурного анализа. В сформированных фазах соседние молекулы ДНК ориентационно упорядочены со средним межмолекулярным расстоянием 2,5–5,0 нм, т.е. фазы по ориентационному порядку похожи на *кристаллы*. Согласно результатам анализа текстур тонких слоёв этих фаз молекулы ДНК являются подвижными, т.е. фазы сохраняют свойства *жидкости* (см., например, [18–20]). В результате этих исследований был предложен термин "жидкокристаллические фазы ДЦ ДНК" и стало возможным устанавливать детали упаковки молекул ДНК в ЖК-фазах, наблюдаемых при увеличении концентрации ДНК. Каскад последовательностей фаз ДНК выглядит следующим образом: изотропная фаза → (голубая фаза?) → холестерическая фаза → колончатая фаза → кристаллическая фаза [20, 21].

Показано также, что смешивание раствора ДЦ ДНК с растворами некоторых гидрофильных полимеров, таких как поли(этиленгликоль) (ПЭГ), полиакриловая кислота или поли(винилпирролидон), приводит к фазовому исключению ДНК. Этот процесс со времён экспериментов Л. Лермана (1971 г.) носит название *psi* (ψ)-конденсации (*psi* — акроним от англ. Polymer-Salt-Induced) [22–25]. Такой метод фазового исключения в зависимости от двух параметров, а именно молекулярной массы (ММ) ДНК и её концентрации, может быть реализован как внутримолекулярная или межмолекулярная конденсация этих молекул.

В первом случае фазовое исключение ДЦ-молекул ДНК с очень большой молекулярной массой ($\geq 10 \times 10^6$ Да), реализуемое при очень низкой концентрации ДНК, приводит к образованию единичных, состоящих из одной молекулы, частиц ДНК, имеющих форму торов [23, 26]. Торообразные частицы ДЦ ДНК, возникающие при осторожном разрушении головок некоторых бактериофагов, впервые были обнаружены в работе [27]; впоследствии такие частицы наблюдали в разных условиях [28].

Несмотря на современные теоретические подходы [29, 30] к описанию внутримолекулярной конденсации ДНК, не существует универсальной теории, которая описывала бы образование тороидальных частиц ДНК.

Во втором случае фазовое исключение (конденсация) низкомолекулярной линейной ДЦ ДНК (молекулярная масса $< 1 \times 10^6$ Да) из водно-солевых растворов ПЭГ [31, 32] или смеси ПЭГ с минеральным маслом [33] при комнатной температуре сопровождается объединением соседних молекул и образованием частиц дисперсии (рис. 1).

Частицы дисперсии — это "микроскопические капли концентрированного раствора ДНК" [34]. С биологической точки зрения частицы дисперсий ДНК представляют собой модельную систему упаковки этой молекулы в простейших биологических объектах. Такая упаковка наблюдается в головках бактериофагов, бактериальных нуклеидах, хромосомах динофлагеллят и ядрах спермиев некоторых животных (лошади, кролика) и человека [35], являющихся, по существу, дисперсными системами микроскопического размера с упорядоченной, но подвижной упаковкой ДНК. Сохранение высокой реакционной способности пар азотистых оснований у молекул ДНК в составе "квазинематических" слоёв частиц дисперсий представляет собой основу для создания чувствительных элементов (биодатчиков) аналитических систем, предназначенных для определения биологически активных и химически значимых соединений, взаимодействующих с этими основаниями [36]. Наконец, переход от ЖК-фаз ДНК к частицам дисперсий приводит к постановке вопроса о том, каким образом упакованы молекулы ДЦ ДНК в этих частицах.

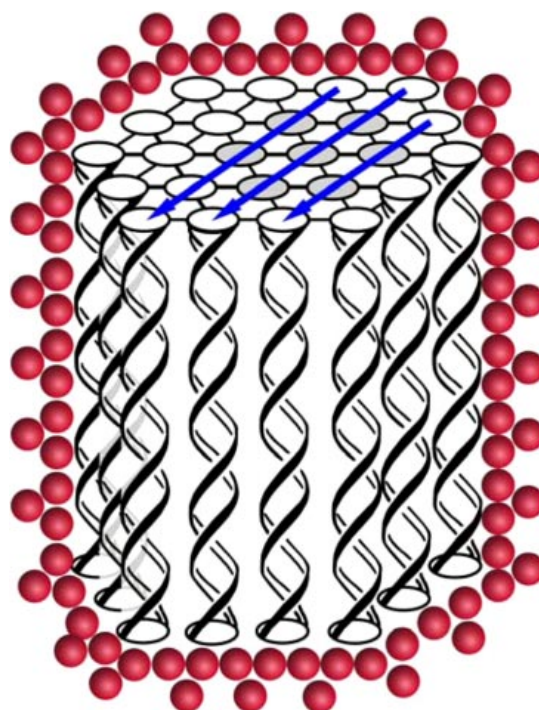


Рис. 1. (В цвете онлайн.) Гипотетическая схема гексагональной упаковки линейных ДЦ-молекул ДНК в частице дисперсии, сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ. Красными кружками схематически изображены молекулы ПЭГ. Стрелками выделены квазинематические слои из молекул ДНК.

Если особенности упаковки молекул ДНК в ЖК-фазах могут быть исследованы с помощью большого числа разных экспериментальных методов, то в случае дисперсий мы имеем дело не с массивными ЖК-системами, а с частицами ДНК небольшого конечного размера. Физико-химические свойства частиц дисперсий в силу так называемого эффекта конечного размера [37] могут значительно отличаться от свойств, характерных для массивных ЖК-фаз. В такой "ограниченной" геометрии может существовать целый ряд метастабильных структур [38], прежде всего потому, что поверхностные свойства частиц могут влиять на их пространственную структуру. Ответ на вопрос об упаковке молекул ДНК в частицах дисперсий не только имеет принципиальный характер, но и требует применения весьма специализированных методов исследования [38].

Поэтому в работе [39] был начат анализ возможных способов упаковки ДЦ-молекул ДНК в частицах ЖКД, сформированных в ПЭГ-содержащих растворах с высоким осмотическим давлением, а в работе [40] было обнаружено появление новой фазы ДНК, названной нами "возвратной" холестерической.

Цель настоящего обзора состоит в том, чтобы обобщить результаты экспериментальных и теоретических исследований свойств частиц ЖКД ДНК, образующихся в разных условиях при фазовом исключении этих молекул из воднополимерных растворов, а также систематизировать новые данные, доказывающие образование и множественность "возвратных" холестерических структур у частиц дисперсий ДНК.

2. Образование и свойства частиц дисперсии ДНК при комнатной температуре

Частицы дисперсии, образующиеся при комнатной температуре в результате фазового исключения полужёст-

ких линейных ДЦ-молекул ДНК из водно-солевых растворов ПЭГ, обладают несколькими особенностями.

1. Теоретическая оценка размера частиц дисперсии показывает, что при молекулярной массе ДНК менее 1×10^6 Да средний диаметр частиц дисперсии близок к 500 нм и в составе одной частицы содержится около 10^4 молекул ДНК [41, 42]. Эта оценка подтверждена результатами прямых измерений размеров "твёрдых" (гель-подобных) частиц дисперсии ДНК, иммобилизованных на ядерном мембранном фильтре [43].

2. Полимер (ПЭГ) не входит в состав образующихся частиц дисперсии ДНК [44–47]. Осмотическое давление ПЭГ-содержащего раствора играет важную роль в стабилизации структуры частиц дисперсий ДНК, образованных в разных условиях [48–51]. Указанный выше размер частиц дисперсии ДНК является результатом баланса между суммарной свободной энергией частиц и их поверхностной свободной энергией [52]. Конкуренция между объёмной свободной энергией частицы дисперсии (которая стремится увеличить размер частицы) и её поверхностной свободной энергией (которая зависит от поверхностного натяжения между ДНК-богатой частицей и окружающим раствором ПЭГ и стремится уменьшить поверхность между ДНК-богатой фазой и окружающим раствором) [52, 53] означает, что существует критический размер частиц дисперсии — при меньших размерах они являются нестабильными или просто не образуются.

3. Полное разделение цепей молекул ДНК в частице дисперсии и их сворачивание в единичные статистические клубки невозможны по стерическим причинам [54, 55]. При постоянном осмотическом давлении пространственная структура частиц дисперсии ДНК, определяемая концентрацией ПЭГ, оказывается стерически ограниченной ("замороженной").

4. Ориентационный параметр порядка (S) молекул нуклеиновых кислот в частицах дисперсий лежит в пределах $\sim 0,6–0,8$ [56], что свидетельствует о высокой тенденции к сохранению неизменной общей пространственной структуры частиц дисперсии. Большая величина параметра порядка означает, что молекулы ДНК, несмотря на ориентационные и конформационные флуктуации и структурные дефекты, стремятся упорядочиваться вдоль общего направления.

5. Плотность упаковки молекул ДНК в частицах дисперсий (среднее расстояние между молекулами ДНК) определяется балансом сил межмолекулярного отталкивания соседних молекул и сжимающим осмотическим давлением ПЭГ в момент их сближения. Экранирование зарядов ДНК и осмотическое давление раствора ПЭГ ускоряют сближение молекул ДНК и их ориентационное нематикоподобное упорядочение. Сочетание таких условий, как минимизация свободного объёма ДЦ-молекул ДНК и необходимость в максимально плотной упаковке наибольшего числа молекул ДНК в малом объёме частицы дисперсии, определяет стремление этих молекул к параллельному (нематическому, ориентационному) расположению в частице дисперсии. Чем выше осмотическое давление ПЭГ-содержащего раствора, т.е. чем больше концентрация ПЭГ в растворе, тем выше плотность упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии, образующихся при фазовом исключении этих молекул.

6. В частицах достигается высокая локальная концентрация линейных полужёстких молекул ДНК. Например, при $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл^{-1} локальная концентрация линейных полужёстких молекул ДНК (C_{DNA}) в частицах дисперсии составляет 299 мг мл^{-1} , а при $C_{\text{PEG}} = 300$ мг мл^{-1} — приблизительно 600 мг мл^{-1} .

3. Гексагональная упаковка молекул ДНК в частицах дисперсии

Очевидно, что максимальная плотность упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии при фазовом исключении этих молекул из полимерсодержащих растворов достигается при их гексагональной упаковке [57]. Такую упаковку иллюстрирует структура, показанная на рис. 1. В этой структуре (так же как и в случае макроскопической гексагональной фазы, образуемой молекулами ДЦ ДНК в водно-солевых растворах) можно, следуя авторам работ [20, 58, 59], допустить существование трёх видов "слоёв" из одинаково упорядоченных в пространстве молекул [60, 61], соответствующих трём основным осям гексагональной структуры (одна серия показана на рис. 1). В этих слоях существует нематический (одномерный) порядок в ориентации линейных молекул ДНК. Молекулы ДНК лежат в плоскости расположенных на расстоянии D слоёв, толщина которых приблизительно равна расстоянию между этими молекулами. Тот факт, что ориентация молекул в каждом слое подобна таковой в нематических жидких кристаллах, послужил основанием для использования термина "квазинематический слой" для его обозначения [21, 62, 63]. Мы будем употреблять этот термин при дальнейшем обсуждении.

Показанная упаковка не является кристаллической, поскольку между молекулами ДНК сохраняется прослойка из молекул воды. Молекулы ДНК могут смещаться относительно друг друга, и каждая молекула ДНК может вращаться вокруг своей длинной оси. (При свободном вращении молекул относительно их длинных осей детальная структура упаковки молекул в ЖК-фазе "теряется" [64].) Кроме того, флуктуации структуры полужёстких молекул ДНК относительно вертикальной оси, приводящие к волнообразным изгибам (*undulation*, *u*) этой структуры [59, 65, 66], также выступают в качестве фактора, нарушающего кристаллическую "жесткость" гексагональной упаковки [67].

Все отмеченные факторы определяют "жидкостный" характер упаковки молекул ДНК.

С учётом возможных локальных отклонений от трёхмерно-периодической схемы укладки [68, 69] гексагональная упаковка молекул ДНК проявляется в дифракционной картине малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в виде одного широкого пика (рефлекса), свидетельствующего лишь о локальном упорядочении этих молекул [57, 68, 69].

Таким образом, при комнатной температуре фазовое исключение полужёстких линейных ДЦ-молекул ДНК из полимерсодержащего раствора приводит к образованию дисперсий, в частицах которых молекулы ДНК упакованы в виде квазинематических слоёв, характеризующихся "ближним" позиционным порядком в расположении этих молекул. Квазинематические слои могут существовать и при гексагональной упаковке молекул ДНК.

4. Холестерическая упаковка молекул ДНК в частицах дисперсии

Наличие у ДЦ-молекул ДНК анизотропных и хиральных свойств (спиральная структура молекул, спиральное расположение противоионов, асимметрия С-атомов сахарных остатков) определяет стремление молекул ДНК к пространственной закрутке в частицах, т.е. к образованию пространственно закрученной фазы [59].

Схема фиксации молекул ДНК в частице ЖКД (см. рис. 1) и упомянутое высокое значение ориентационного

параметра порядка показывают, что пространственная закрутка соседних молекул возможна только в том случае, когда соседние слои из молекул ДНК поворачиваются в пространстве.

Если при большом расстоянии между ДЦ-молекулами ДНК взаимодействие между ними может быть описано как взаимодействие между гомогенно заряженными палочками, то при уменьшении расстояния до 5,0 нм (и менее), происходящем при увеличении осмотического давления ПЭГ, вклад во взаимодействие начинает вносить так называемое хиральное взаимодействие, обусловленное как анизотропными (хиральными) свойствами самих молекул ДНК, так и хиральностью межмолекулярных взаимодействий [70].

Основной эффект от хиральности состоит в том, что хиральные молекулы не стремятся упаковываться параллельно по отношению к своим соседям, а, скорее, образуют небольшой угол по отношению к ним, т.е. хиральность способствует макроскопической закрутке молекул с некоторым характерным шагом [71].

Следовательно, при упаковке молекул ДНК в частицах дисперсии возникает конкуренция между нематическим упорядочением (параллельным расположением) молекул ДНК в частицах дисперсии, обусловленным сжимающим осмотическим давлением ПЭГ, и закруткой этих молекул в пространстве, которая связана с хиральностью молекул ДНК. При определённом сочетании осмотического давления и температуры раствора анизотропный и хиральный вклады в суммарную энергию взаимодействия молекул ДНК приводят к "дальнему" ориентационному упорядочению этих молекул, т.е. происходит спиральная пространственная (холестерическая) закрутка слоёв из молекул ДНК, упакованных в частицах дисперсии [72].

Надо иметь в виду, что если молекулы ДНК в соседних слоях частицы дисперсии вращаются вокруг своих осей независимо друг от друга, то их хиральные взаимодействия могут быть усреднены, что может привести к обращению в нуль суммарного эффекта. Для заметного проявления эффекта хирального взаимодействия в рассматриваемой системе поведение ближайших соседних молекул ДНК должно быть скоррелировано [73].

Так как хиральное взаимодействие убывает с увеличением расстояния между молекулами быстрее, чем основные (не хиральные) электростатические силы, хиральные эффекты становятся существенными на небольших расстояниях между молекулами ДНК, при которых молекулы "чувствуют" хиральность друг друга.

Минимум энергии достигается при взаимном повороте соседних молекул ДНК на некоторый угол, т.е. хиральность способствует макроскопической закрутке молекул с характерным пространственным шагом P . При этих условиях возникает пространственно закрученная (холестерическая) структура частиц дисперсии ДНК (с расстоянием между молекулами от 5,0 до 3,0 нм) [20, 35]. Величина шага P составляет около 250 нм, что соответствует углу закрутки соседних слоёв из молекул ДНК в частице дисперсии на $\approx 0,7^\circ$ [20, 21, 41].

Величина и знак хирального взаимодействия могут зависеть как от небольших изменений структуры ДНК [74], так и от температуры [72].

Холестерическая упаковка молекул ДНК в частицах ЖКД будет проявляться в виде текстуры "отпечатков пальцев" у фаз, формируемых при концентрировании частиц дисперсий ДНК в результате низкоскоростной седиментации.

5. Спектры кругового дихроизма дисперсий ДНК

Однозначное доказательство формирования пространственно закрученной структуры частиц дисперсии ДНК было получено при использовании идеологии метода "внешнего хромофора", вводимого в холестерические ЖК-фазы синтетических соединений [75–78].

Согласно этому методу при определённом способе расположения молекул внешнего хромофора в холестерической фазе в полосе поглощения этого хромофора в спектре кругового дихроизма (КД) возникает интенсивная полоса [79–81].

В структуре ДЦ-молекул ДНК имеются азотистые основания (хромофоры, поглощающие в ультрафиолетовой (УФ) области спектра), которые достаточно жёстко фиксированы по отношению к длинной оси этих молекул (угол наклона оснований около 90°).

Образование слоя из соседних молекул ДНК означает, что азотистые основания оказываются встроенными (введёнными) в его структуру и возникающая структура является "окрашенной".

В пользу этого свидетельствует тот факт, что при определённой геометрии прохождения пучка поляризованного света [82, 83] через некоторые участки тонких слоёв холестерической фазы ДНК в спектрах КД наблюдается необычная полоса (рис. 2, кривая 2). Следует, конечно, добавить, что в тонких плёнках ЖК-фаз в принципе трудно достигнуть точного расположения холестерической фазы по отношению к пучку света. Гомогенная ориентация (без дефектов) такой фазы наблюдается только в исключительных случаях и лишь на очень небольших участках плёнки. Это обстоятельство влияет на положение и величину амплитуды интенсивной полосы в спектре КД [83]. Тем не менее появление такой полосы в спектре КД в области поглощения хромофоров ДНК (азотистых оснований) указывает на спиральную пространственную упаковку молекул ДНК в холестерической фазе [84].

Теория, учитывающая идеологию метода внешнего хромофора, "дальний" (ориентационный) порядок в расположении азотистых оснований в слоях, образованных низкомолекулярными (молекулярная масса менее 1×10^6 Да) молекулами ДНК, и пространственную спиральную закрутку этих слоёв в частицах дисперсий, предсказывает появление интенсивной полосы в спектре КД дисперсий [85]. При спиральной (или, как говорят, холестерической) упаковке соседних молекул ДНК в образующихся частицах интенсивная полоса в спектре КД должна располагаться в области поглощения азотистых оснований [85].

На рисунке 3 в качестве примера сопоставлены спектры КД водно-солевого раствора линейной В-формы ДНК (рис. 3а) и теоретически рассчитанный спектр КД холестерической ЖКД ДНК (рис. 3б). Рисунок 3 показывает, что формирование дисперсии ДНК действительно приводит к появлению интенсивной полосы в спектре КД в УФ-области (в области поглощения азотистых оснований). Поскольку пары азотистых оснований жёстко фиксированы по отношению к длинной оси молекул ДНК, спиральная упаковка азотистых оснований возможна лишь в том случае, когда соседние молекулы ДНК в частицах дисперсий образуют пространственную спиральную закрученную (холестерическую) структуру.

Не останавливаясь подробно на описании деталей теории спектров КД ДНК [85], можно выделить те результаты расчётов, которые являются наиболее важными в рамках настоящего обзора.

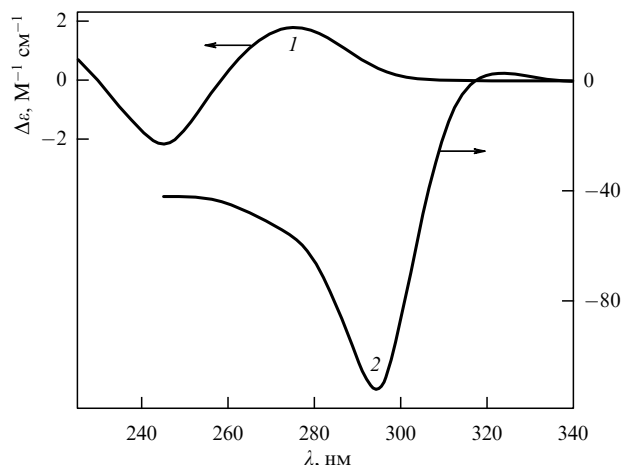


Рис. 2. Спектры КД водно-солевого (0,3 М NaCl) раствора линейной ДЦ-В-формы ДНК (кривая 1, левая ось ординат) и тонкого слоя (≈ 20 мкм) холестерической ЖК-фазы ДНК (кривая 2, правая ось ординат). Молярный круговой дихроизм, представляющий собой разность поглощения света с левой (A_L) и правой (A_R) круговыми поляризациями, $\Delta\varepsilon = (A_L - A_R)/(CL)$, где C — концентрация ДНК [М, или моль л $^{-1}$], L — толщина (длина оптического пути) прямоугольной кварцевой кюветы [см], A_L и A_R измеряются в оптических единицах.

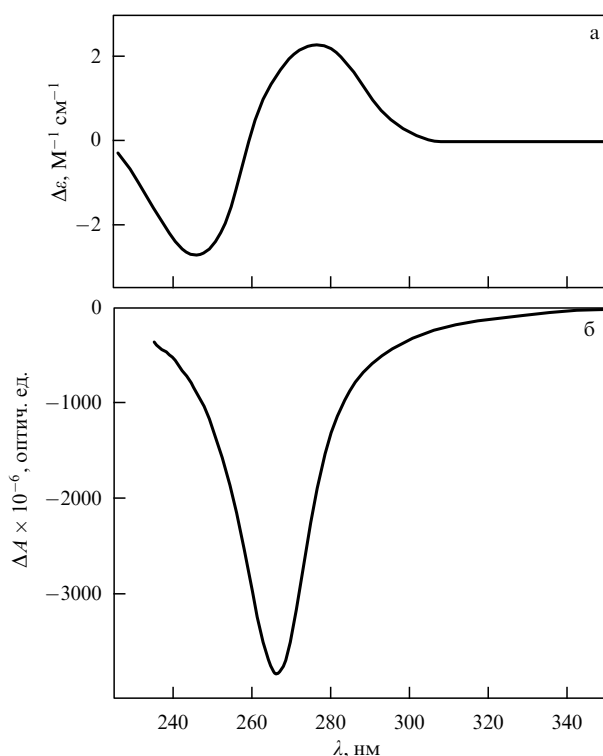


Рис. 3. Спектр КД водно-солевого (0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -фосфатный буфер) раствора линейной ДЦ-В-формы ДНК (а) и теоретически рассчитанный спектр КД холестерической ЖКД ДЦ ДНК (б). $C_{DNA} = 10$ мкг мл $^{-1}$, шаг спирально закрученной структуры частицы дисперсии ДНК $P = 2500$ нм, её диаметр $D = 500$ нм. $\Delta A = A_L - A_R$, $L = 1$ см.

Амплитуда полосы в спектре КД (рис. 3б) зависит (при постоянстве вторичной структуры ДНК и свойств азотистых оснований) от концентрации частиц дисперсии, а также от *структурных параметров* частиц дисперсии (молекулярная масса ДНК, шаг спиральной закрутки пространственной структуры, размер частиц дисперсии и т.д.) [86]. Эта интенсивная полоса отражает так называемый

структурный круговой дихроизм [80], и её характеризуют величиной амплитуды ΔA (в оптических единицах) полосы в спектре КД. Чтобы подчеркнуть принципиальное различие между *молекулярным* круговым дихроизмом, который отражает свойства изолированных азотистых оснований или азотистых оснований в составе линейных неконденсированных молекул ДНК, и *структурным* круговым дихроизмом, для обозначения интенсивных полос в спектрах КД частиц с холестерической упаковкой молекул ДНК независимо от их знака был введён термин *аномальная полоса* [87]; при описании свойств частиц дисперсий используется также термин *аномальная оптическая активность*.

Расчёты позволили не только уточнить условия (размер частиц дисперсии, шаг спиральной структуры и т.д.), при которых теоретически будет появляться аномальная полоса в спектрах КД дисперсий в области поглощения хромофоров ДНК, но и определить свойства водно-полимерного раствора, при которых она может быть зарегистрирована экспериментально.

В частности, на рис. 4 приведена зависимость амплитуды аномальной полосы от диаметра частиц дисперсий, полученных в результате фазового исключения молекул низкомолекулярной ДНК (молекулярная масса менее 1×10^6 Да) из водно-солевого раствора ПЭГ, а на рис. 5 — от шага холестерической спирали таких частиц.

Кроме того, теория предсказала появление дополнительной аномальной полосы в области поглощения соединений, определённым образом расположенных между парами азотистых оснований ДНК.

На рисунке 6 в качестве примера приведены теоретически рассчитанные спектры КД дисперсий, полученных при фазовом исключении молекул ДНК, образующих комплекс с окрашенным антибиотиком — дауномицином (ДАУ). Молекулы ДАУ могут встраиваться между парами азотистых оснований ДНК. При расчётах принималось, что основная полоса поглощения хромофоров ДАУ расположена в видимой области спектра ($\lambda_{max} \sim 500$ нм).

Видно, что при малой концентрации ДАУ фазовое исключение молекул ДНК, связанных с ДАУ, сопровождается двумя оптическими эффектами: во-первых, ано-

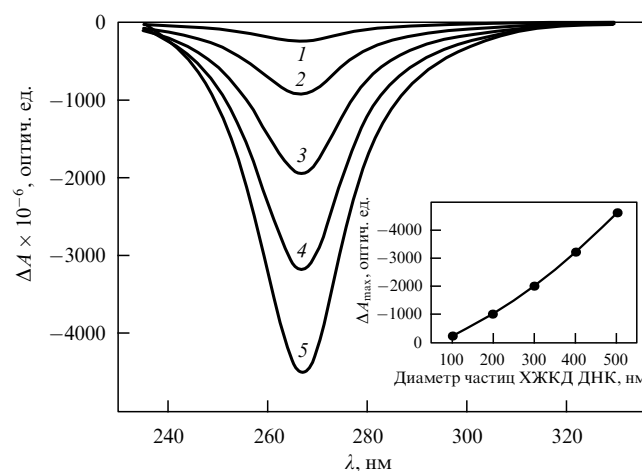


Рис. 4. Теоретически рассчитанные спектры КД холестерических ЖКД ДНК, частицы которых имеют разных размер (диаметр): $D = 100, 200, 300, 400$ и 500 нм (кривые 1–5 соответственно). $C_{DNA} = 10$ мкг мл $^{-1}$, $P = 2500$ нм, $L = 1$ см. На вставке: зависимость амплитуды (ΔA_{max}) аномальной отрицательной полосы в спектре КД холестерической ЖКД от размера (диаметра) частиц дисперсий ДНК.

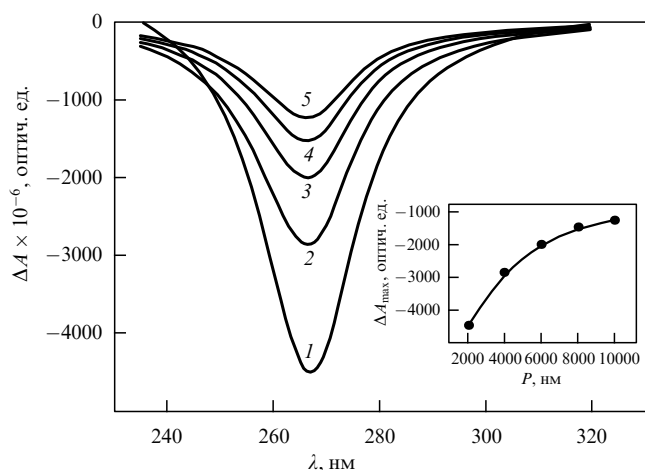


Рис. 5. Теоретически рассчитанные спектры КД холестерических ЖКД ДНК, частицы которых различаются шагом холестерической спирали: $P = 2000, 4000, 6000, 8000$ и 10000 нм (кривые 1–5 соответственно). $C_{\text{DNA}} = 10$ мкг мл^{-1} , $D = 500$ нм, $L = 1$ см. На вставке: зависимость амплитуды (ΔA_{max}) аномальной отрицательной полосы в спектре КД от шага P пространственно закрученной структуры холестерической ЖКД ДНК.

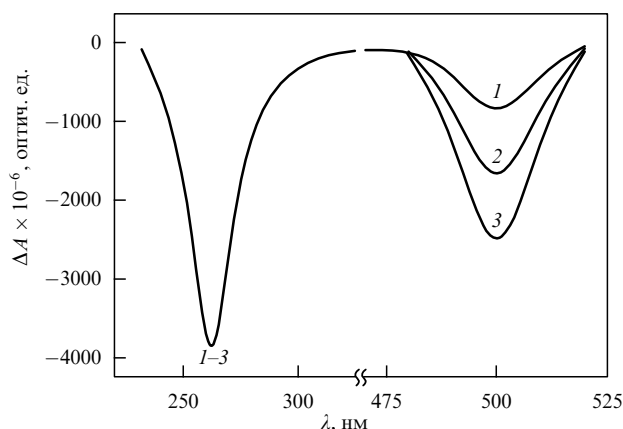


Рис. 6. Теоретически рассчитанные спектры КД холестерической ЖКД, сформированной из молекул ДНК, связанных с антибиотиком — дауномицином (кривые 1–3 соответствуют разным концентрациям C_a антибиотика: $C_{a3} > C_{a2} > C_{a1}$). $C_{\text{DNA}} = 10$ мкг мл^{-1} , $D = 350$ нм, $P = 2500$ нм, $L = 1$ см.

мальная отрицательная полоса в области поглощения азотистых оснований ДНК не меняется; во-вторых, в области поглощения хромофоров ДАУ в видимой области спектра КД появляется дополнительная полоса. Появление этой полосы в спектре КД, знак которой совпадает со знаком аномальной полосы в области поглощения азотистых оснований, означает, что молекулы ДАУ не только связаны с молекулами ДНК в комплексе, но и ориентированы в этом комплексе по отношению к оси холестерической структуры частиц дисперсии ДНК под таким же углом ($\sim 90^\circ$), как и пары азотистых оснований. Это возможно только в случае встраивания (интеркаляции) молекул ДАУ между парами азотистых оснований ДНК. Наконец, амплитуда полосы в области поглощения ДАУ зависит от концентрации антибиотика, связанного с молекулой ДНК. Это открывает возможность для определения концентрации ДАУ с помощью метода кругового дихроизма.

Таким образом, регистрация спектров КД позволяет не только судить о характере пространственной упаковки молекул ДНК в частицах дисперсии, но и определять

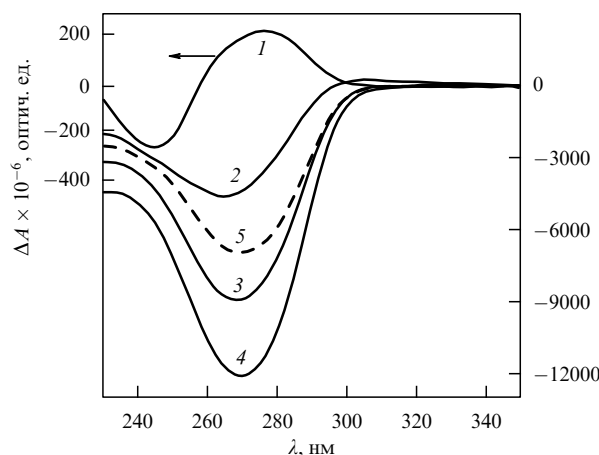


Рис. 7. Экспериментальные спектры КД водно-солевого раствора линейной В-формы ДНК (кривая 1, левая ось ординат) и ЖКД, полученных в результате фазового исключения ДЦ-молекул ДНК (ММ ДНК $\leq 1 \times 10^6$ Да) из водно-солевых растворов с разной концентрацией ПЭГ (кривые 2–5, правая ось ординат): 1 — $C_{\text{PEG}} = 0$, 2 — $C_{\text{PEG}} = 120$ мг мл^{-1} , 3 — $C_{\text{PEG}} = 130$ мг мл^{-1} , 4 — $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл^{-1} , 5 — $C_{\text{PEG}} = 200$ мг мл^{-1} , $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл^{-1} , 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер, $L = 1$ см, $T = 22^\circ\text{C}$.

способ расположения разных соединений на молекулах ДНК в этих частицах.

В целом, результаты теоретических расчётов спектров КД свидетельствуют о том, что в частицах дисперсии жёсткие анизотропные молекулы ДНК реализуют своё потенциальное стремление к пространственной закрученной (холестерической) упаковке. Поэтому для частиц ЖКД ДНК, имеющих аномальную полосу в спектре КД, используют название *холестерическая жидкокристаллическая дисперсия* (ХЖКД).

Интерес представляет сопоставление результатов теоретических расчётов спектров КД с экспериментально измеренными спектрами.

На рисунке 7 сопоставлен спектр КД линейной формы ДНК (кривая 1) с экспериментальными спектрами КД ЖКД, сформированных в результате фазового исключения низкомолекулярной ДНК из водно-солевых растворов ПЭГ разной концентрации (кривые 2–5). Видно, что практически во всех использованных условиях формирование дисперсий ДНК сопровождается появлением аномальной отрицательной полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований. Согласно теории [88] появление такой полосы свидетельствует о том, что соседние молекулы ДНК в частицах дисперсии образуют пространственную спирально закрученную (холестерическую) структуру.

В пользу образования частиц дисперсии ДНК с холестерической упаковкой молекул свидетельствует также тот факт, что тонкий слой фазы, полученной при седиментации частиц дисперсии ДНК, имеет оптическую текстуру "отпечатков пальцев" (рис. 8), характерную для холестерической фазы [84].

Уменьшение амплитуды отрицательной аномальной полосы в спектре КД вплоть до нуля, наблюдаемое при увеличении концентрации ПЭГ (см. рис. 7), свидетельствует о раскрутке пространственной спиральной структуры частиц дисперсии [89].

Следовательно, регистрация спектра КД в области поглощения азотистых оснований позволяет судить о состоянии пространственной структуры частиц ХЖКД

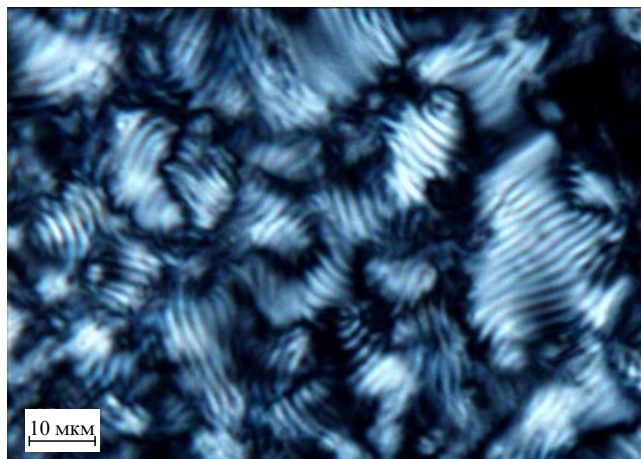


Рис. 8. Оптическая текстура тонкого слоя холестерической ЖК-фазы, полученной в результате низкоскоростного центрифугирования частиц дисперсии низкомолекулярной ДНК (ММ ДНК $\sim (0,2-0,3) \times 10^6$ Да), сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ. $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл $^{-1}$, $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл $^{-1}$, ММ ПЭГ = 4000 Да, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -фосфатный буфер.

ДНК. Следует отметить, что в отличие от обычной агрегации молекул ДНК, которая может происходить при любой длине этих молекул и не сопровождается появлением аномальной оптической активности, ХЖКД при фазовом исключении молекул ДНК формируется только в тех случаях, когда длина молекул ДНК превышает 150 Å (~ 50 пар нуклеотидов). При этом фазовое исключение молекул высокомолекулярной ДНК (молекулярная масса более 10^6 Да) из водно-солевых растворов ПЭГ, хотя и приводит к агрегации соседних молекул ДНК, тем не менее не сопровождается появлением ни интенсивной полосы в спектре КД (рис. 9а), ни специфической текстуры "отпечатков пальцев" (рис. 9б).

Наконец, регистрация спектров КД дисперсий, сформированных при разной концентрации ПЭГ, показывает, что существуют дисперсии ДНК с разной упаковкой этих молекул в частицах дисперсий.

На рисунке 10 приведена зависимость максимальной амплитуды отрицательной аномальной полосы в спектре КД от осмотического давления раствора ПЭГ (концент-

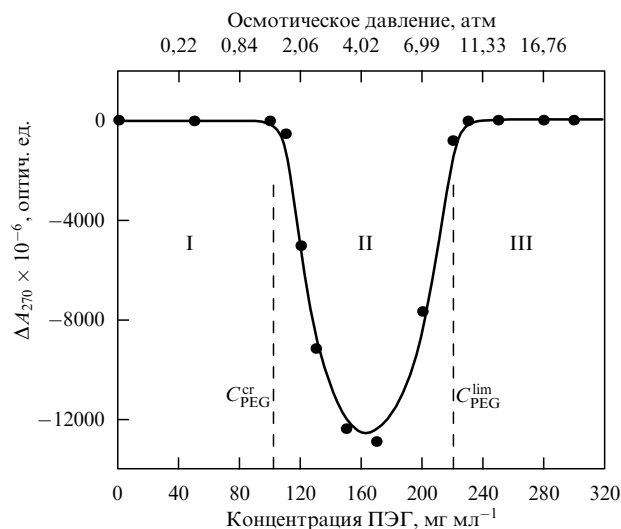


Рис. 10. Зависимость измеренной амплитуды ΔA_{270} аномальной полосы в спектрах КД водно-солевых растворов ДНК на длине волны $\lambda = 270$ нм от концентрации ПЭГ. На верхней оси абсцисс приведены значения осмотического давления растворов ПЭГ, концентрации которых указаны на нижней оси абсцисс. $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл $^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -фосфатный буфер. $L = 1$ см, $T = 22^\circ\text{C}$, $C_{\text{PEG}}^{\text{cr}}$ и $C_{\text{PEG}}^{\text{lim}}$ — соответственно критическая и предельная концентрации ПЭГ, определяющие "граничные" условия существования ЖКД с разной упаковкой молекул ДНК (область домена II и область домена III).

рации ПЭГ). Видно, что при комнатной температуре возможны два способа упаковки полужестких линейных молекул ДНК. При осмотическом давлении раствора от 1 до 10 атм существует пространственно закрученная (холестерическая) упаковка молекул ДНК в частицах дисперсий (область домена II), которая легко детектируется по появлению аномальной полосы в спектре КД в области поглощения азотистых оснований ДНК. В пользу такой упаковки свидетельствует текстура тонкого слоя фазы ДНК, образованной в результате низкоскоростной седиментации частиц ДНК (см. рис. 8). Это текстура "отпечатков пальцев", которая характерна для холестериков.

Частицы дисперсий, сформированные при осмотическом давлении более 10 атм ($C_{\text{PEG}} \sim 240-300$ мг мл $^{-1}$,

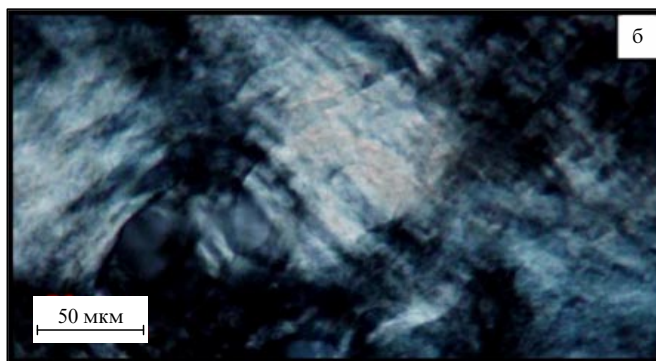
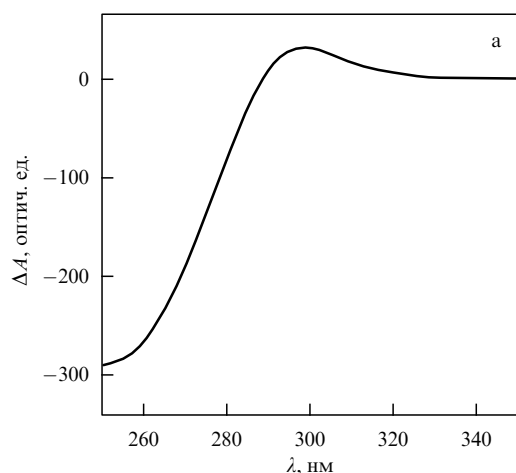


Рис. 9. (а) Экспериментально измеренный спектр КД ЖКД, полученной в результате фазового исключения ДЦ-молекул ДНК высокой молекулярной массы ($\sim 13 \times 10^6$ Да) из водно-солевого раствора ПЭГ. (Весьма малая амплитуда полосы в спектре воспринимается как значение, близкое к нулю, при регистрации спектра в обычных условиях.) (б) Оптическая текстура тонкого слоя ЖК-фазы, полученной в результате низкоскоростного центрифугирования частиц дисперсии высокомолекулярной ДНК, сформированной в водно-солевом растворе ПЭГ. $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл $^{-1}$, $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл $^{-1}$, молекулярная масса ПЭГ 4000 Да, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -фосфатный буфер).

область домена III), практически не имеют аномальной полосы в спектре КД [20]. Отсутствие аномальной полосы в спектрах КД дисперсий показывает, что упаковка молекул ДЦ ДНК в частицах дисперсий, образованных при концентрациях ПЭГ, соответствующих области домена III, отличается от упаковки этих молекул в области домена II. При этом текстура тонкого слоя фазы ДНК, образованной в результате низкоскоростной седиментации частиц дисперсии ДНК, сформированной при высокой концентрации ПЭГ, свидетельствует об отсутствии "отпечатков пальцев". Эта текстура содержит лишь фрагменты, обладающие оптической анизотропией.

Таким образом, регистрация спектров КД показывает, что фазовое исключение ДЦ-молекул ДНК низкой молекулярной массы (менее 1×10^6 Да) при комнатной температуре из водно-солевых растворов ПЭГ приводит к формированию частиц ЖКД, различающихся, в зависимости от осмотического давления ПЭГ, способом упаковки этих молекул.

С учётом диаграммы, представленной на рис. 10, можно утверждать следующее: при фазовом исключении ДЦ-молекул ДНК низкой молекулярной массы с увеличением концентрации ПЭГ в растворе (при комнатной температуре) реализуется следующая последовательность фазовых переходов: изотропная фаза (область домена I) $\rightarrow$ холестерическая фаза (область домена II) $\rightarrow$ гексагональная фаза (область домена III) ДНК.

6. Частицы жидкокристаллических дисперсий ДНК, образующиеся при повышенной температуре

На рисунке 11 в качестве примера показано изменение спектра КД дисперсии ДЦ ДНК, сформированных в области домена II (кривая 1, $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл $^{-1}$, осмотическое давление $\pi = 4,6$ атм) при нагревании и последующем охлаждении (кривые 2 и 3 соответственно). Хорошо

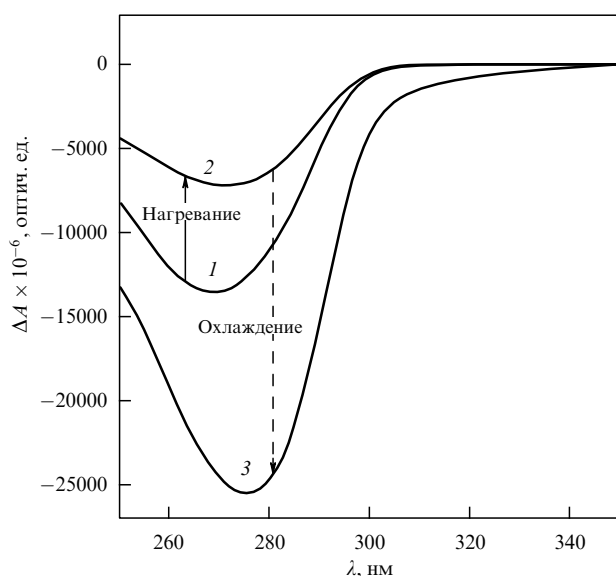


Рис. 11. Спектры КД холестерической дисперсии ДНК, сформированной в области домена II ($C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл $^{-1}$, кривая 1), при нагревании (кривая 2) и последующем охлаждении (кривая 3): 1 — 22°C, 2 — 80°C, 3 — 80°C $\rightarrow$ 22°C. $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл $^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -фосфатный буфер, $L = 1$ см. Сплошной и штриховой стрелками показано изменение амплитуды аномальной полосы в спектре КД ХЖКД ДНК при нагревании и охлаждении соответственно.

изученный процесс уменьшения амплитуды аномальной полосы в спектре КД холестерической дисперсии при нагревании (ср. кривые 1 и 2 на рис. 11), который носит название "КД-плавления" [41], отражает раскручивание пространственной спиральной структуры частиц дисперсий.

Охлаждение дисперсии сопровождается не только восстановлением аномальной полосы в спектре КД, но и увеличением её амплитуды (кривая 3). Такой эффект вполне соответствует представлению об улучшении характера упаковки ДЦ ДНК в пространственной структуре частиц дисперсий в результате "термической тренировки" ЖКД [90, 91]. Отмеченное изменение спектра КД при нагревании и охлаждении характерно для всех дисперсий, сформированных в области осмотического давления ПЭГ, соответствующего домену II.

На рисунке 12 в качестве примера показано изменение спектров КД дисперсии ДНК, имеющей гексагональную упаковку молекул, при её нагревании и охлаждении. Эта дисперсия сформирована в области концентраций ПЭГ, соответствующих домену III ($C_{\text{PEG}} = 250$ мг мл $^{-1}$, $\pi = 12,43$ атм). В этом случае увеличение температуры сопровождается необычным оптическим эффектом [40, 92]: у частиц дисперсии ДНК, практически не имевшей при комнатной температуре аномальной полосы в спектре КД (см. рис. 12, кривая 1), такая полоса появляется (см. рис. 12, кривая 2).

Аналогичным образом меняется при нагревании вид спектров КД у всех дисперсий, сформированных в области домена III. При этом увеличение амплитуды аномальной полосы в спектре КД происходит при определённой критической температуре ($T^{\text{cr}} [^{\circ}\text{C}]$) нагрева [92], зависящей от осмотического давления ПЭГ (рис. 13а, кривые 1-1-3-1). Рисунок 13б показывает, что чем выше осмотическое давление ПЭГ, тем больше величина T^{cr} , при которой происходит амплификация аномальной полосы в спектре КД при нагревании частиц дисперсий с гексагональной упаковкой молекул ДНК.

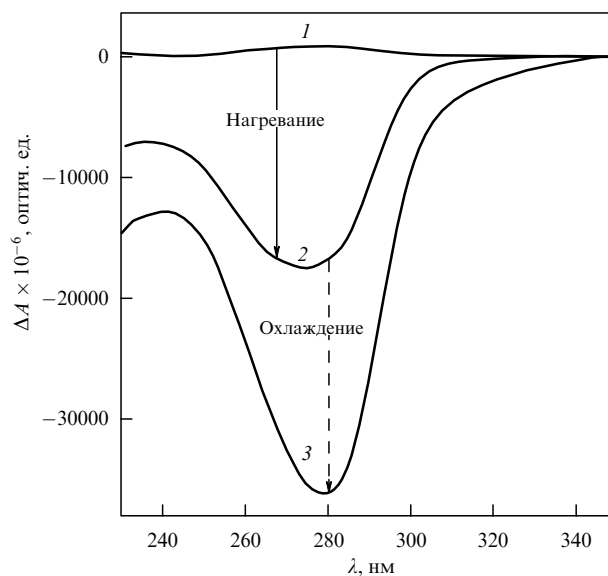


Рис. 12. Спектры КД дисперсии ДНК, сформированной в области домена III ($C_{\text{PEG}} = 250$ мг мл $^{-1}$, кривая 1), при нагревании (кривая 2) и последующем охлаждении (кривая 3): 1 — 22°C, 2 — 80°C, 3 — 80°C $\rightarrow$ 22°C. $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл $^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na $^{+}$ -фосфатный буфер, $L = 1$ см. Сплошной и штриховой стрелками показано изменение амплитуды аномальной полосы в спектре КД ХЖКД ДНК при нагревании и охлаждении соответственно.

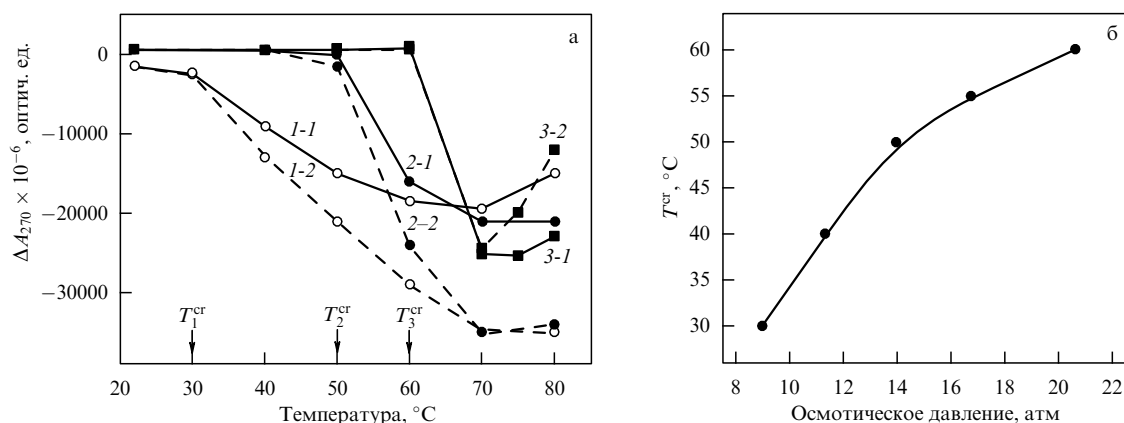


Рис. 13. (а) Температурная зависимость амплитуды аномальной полосы ($\lambda = 270$ нм) в спектрах КД ЖКД ДНК, сформированных в области домена III в водно-солевых растворах с разной концентрацией ПЭГ (сплошные кривые 1-1–3-1): 1 — $C_{\text{PEG}} = 220$ мг мл^{-1} , 2 — $C_{\text{PEG}} = 260$ мг мл^{-1} , 3 — $C_{\text{PEG}} = 300$ мг мл^{-1} . Штриховые кривые характеризуют оптические свойства ЖКД ДНК, сформированных при $C_{\text{PEG}} = 220, 260$ и 300 мг мл^{-1} (кривые 1-2, 2-2 и 3-2 соответственно), после цикла нагревание → охлаждение: $30^\circ\text{C} \rightarrow 22^\circ\text{C}$, $40^\circ\text{C} \rightarrow 22^\circ\text{C}$, $50^\circ\text{C} \rightarrow 22^\circ\text{C}$, $60^\circ\text{C} \rightarrow 22^\circ\text{C}$, $70^\circ\text{C} \rightarrow 22^\circ\text{C}$ и $80^\circ\text{C} \rightarrow 22^\circ\text{C}$. $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл^{-1} , $0,3$ М NaCl + $0,002$ М Na^+ -фосфатный буфер, $L = 1$ см. T_{cr} — "критическая" температура, при которой начинается амплификация аномальной полосы в спектре КД при нагревании ЖКД ДНК. Стрелками указаны значения критической температуры ($T_{\text{cr}1-3}$), характерные для ЖКД ДНК, сформированных при концентрации ПЭГ 220, 260 и 300 мг мл^{-1} соответственно. (б) Зависимость T_{cr} от осмотического давления водно-солевых растворов ПЭГ.

На рисунке 14 сопоставлены кривые, характеризующие аномальную оптическую активность у всех ЖКД ДНК, сформированных как в области домена II, так и в области домена III осмотического давления ПЭГ при их нагревании (кривая 2) и охлаждении (кривая 3).

Фазовая диаграмма, приведённая на рис. 14, показывает, что понижение температуры ЖКД ДНК сопровождается, в зависимости от осмотического давления ПЭГ,

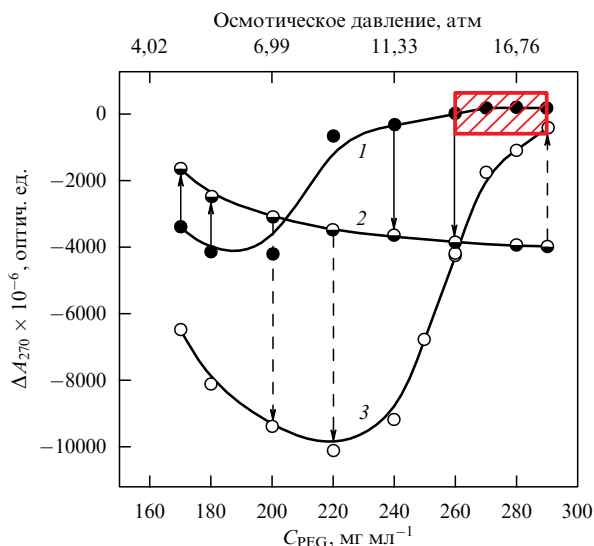


Рис. 14. Зависимость амплитуды ΔA_{270} аномальной полосы ($\lambda = 270$ нм) в спектрах КД ЖКД ДНК, сформированных при комнатной температуре в водно-солевых растворах ПЭГ с разным осмотическим давлением (кривая 1), нагретых до 80°C (кривая 2) и охлажденных до комнатной температуры (кривая 3). $C_{\text{DNA}} = 10$ мкг мл^{-1} , $0,3$ М NaCl + $0,002$ М Na^+ -фосфатный буфер, $L = 1$ см. Сплошными стрелками показано изменение амплитуды аномальной полосы в спектре КД при увеличении температуры от 22°C до 80°C , а штриховыми — при охлаждении от 80°C до 22°C . Заштрихованный прямоугольник в случае частиц ДНК, имеющих гексагональную упаковку, обозначает область неточных определений малых (близких к нулю) значений амплитуды полосы, зависящих от "истории" приготовления этих частиц.

разными оптическими эффектами [92]. При осмотическом давлении ПЭГ до 10 атм величина аномальной оптической активности возрастает при охлаждении (см. рис. 14, кривая 3), тогда как при осмотическом давлении ПЭГ больше 10 атм наблюдается тенденция к частичному восстановлению исходной аномальной оптической активности ЖКД (см. рис. 14).

Надо отметить, что общий вид показанной фазовой диаграммы характерен для всех полужёстких линейных ДЦ-молекул ДНК (молекулярная масса $\leq 1 \times 10^6$ Да), использованных для получения дисперсий, однако конкретный вид диаграммы (амплитуда наблюдаемого эффекта и положение его минимума) зависит от молекулярной массы, нуклеотидного состава и концентрации ДНК и, по-видимому, от температурной истории дисперсии.

Поскольку аномальная полоса в спектре КД отражает спиральную (холестерическую) упаковку квазинематических слоёв ДЦ-молекул ДНК в частицах ЖКД [88], можно предположить, что нагревание всех частиц с первоначальной гексагональной упаковкой молекул ДЦ ДНК (домен III) приводит к возникновению новой пространственно закрученной структуры этих молекул [39]. Такое новое структурное состояние молекул ДНК в частицах дисперсий было названо нами в работе [40] "возвратным" холестерическим, т.е. при нагревании частиц дисперсии с гексагональной упаковкой молекул ДНК имеет место фазовый переход гексагональная → возвратная холестерическая упаковка.

Следует иметь в виду, что "классическое" холестерическое состояние реализуется при среднем расстоянии между молекулами ДНК, близком к 35 Å [11, 41].

Поскольку в нашем случае увеличение осмотического давления в области концентраций ПЭГ, соответствующих домену III, сопровождается не только уменьшением среднего расстояния между молекулами ДНК в пределах от 28 до 24 Å [40], но и возможным искажением вторичной структуры этой молекулы, требуется проверить степень "холестеризма" в упаковке молекул ДНК в частицах, имеющих "возвратную" структуру, т.е., как минимум, необходимо определить состояние вторичной структуры этих молекул в условиях высокой концентрации ПЭГ [93–95].

7. Интеркаляция антибиотиков между парами оснований ДНК в частицах дисперсий с разной упаковкой молекул

Состояние вторичной структуры ДНК в частицах дисперсий, образованных при разном осмотическом давлении раствора, было проверено в результате интеркаляции (встраивания) антибиотика антрациклинового ряда — доксорубина (ДОКС) между парами азотистых оснований ДНК. Этот антибиотик является аналогом ДАУ; теоретически рассчитанные спектры КД комплексов ДАУ с молекулами ДНК в составе частиц холестерических дисперсий показаны на рис. 6.

Структурными компонентами антрациклиновых антибиотиков являются агликон (антрациклин) и сахарный остаток [96–99]. Структура антибиотиков установлена с помощью химических и физико-химических методов [97] и подтверждена прямым химическим синтезом. Эти антибиотики — водорастворимые низкомолекулярные соединения, имеющие четыре реакционно-способных атома кислорода в положениях 5, 6, 11 и 12 антрациклинового агликона (рис. 15). Антибиотики антрациклинового ряда имеют полосы поглощения как в видимой области, так и в УФ-области спектра [99]; одна полоса расположена в интервале длин волн 400–600 нм, другая — в области 200–300 нм соответственно.

В работах [100, 101] проведён расчёт переходных моментов в молекулах антрахинонов и антрациклинов. Показано, что в случае антрахинона, для которого характерны полосы поглощения с максимумом при 476 и 340 нм, длинноволновый момент перехода лежит в плоскости хромофора и направлен вдоль оси, соединяющей атомы кислорода, т.е. вдоль длинной оси молекулы, и локализован в плоскости хромофора антрахинона.

При добавлении ДЦ-молекул ДНК к антрациклиновым антибиотикам длинноволновая полоса смещается на 20–30 нм (в зависимости от структуры антибиотика) в сторону длинных волн (батохромный сдвиг) и её интенсивность уменьшается (гипохромный эффект) [97].

Наличие гипохромного эффекта в полосе поглощения антибиотика в присутствии ДЦ ДНК отражает уменьшение полярности окружения хромофора антибиотика при его связывании с ДНК, которое вызвано встраиванием (интеркаляцией) плоской хромофорной части антибиотика между парами азотистых оснований молекулы ДНК.

В случае ДАУ и некоторых других антрациклиновых антибиотиков их взаимодействие с ДНК сопровождается

тушением люминесценции [102], что указывает на изменение их электронного состояния в составе комплекса с ДНК.

Важным доказательством интеркаляции антрациклинов служит раскручивание кольцевых ковалентно замкнутых суперспиральных ДНК при их взаимодействии с антибиотиками и красителями. Раскручивание кольцевой суперспиральной ДНК при взаимодействии с антибиотиком сопровождается изменением её гидродинамических характеристик и также является свидетельством образования интеркаляционного комплекса с ДНК. Угол раскручивания двойной спирали молекулы ДНК при взаимодействии с ДАУ, иремицином и виоламицином В1 приблизительно вдвое меньше [103] угла раскручивания, характерного для бромистого этидия (20°). Добавление антрациклиновых антибиотиков к ДНК приводит к увеличению её вязкости и уменьшению коэффициента седиментации [104], что связано с увеличением контурной длины и жёсткости молекулы ДНК при связывании с антибиотиком.

Расчёты, приведённые в работах [104, 105], показывают, что увеличение контурной длины ДНК (ΔL) при её связывании с антрациклиновыми антибиотиками может достигать 27–30%, что в расчёте на одну молекулу антибиотика, связанного с ДНК, составляет 3,6–4,0 Å. Увеличение жёсткости ДНК при связывании одной молекулы антибиотика, оцениваемое по изменению персистентной длины ДНК, составляет: 3,6 Å для ДАУ, 3,4 Å для адриамицина, 3,0 Å для акламицина, что превышает значение этого параметра для акридиновых красителей. Увеличение контурной длины ДНК при её взаимодействии с антрациклиновыми антибиотиками ещё раз свидетельствует об интеркаляции антибиотика между парами оснований ДНК, сопровождающейся частичным раскручиванием молекулы ДНК и её удлинением.

В комплексе ДНК с антрациклиновым антибиотиком плоскость хромофора антибиотика располагается приблизительно параллельно плоскости пар оснований ДНК, т.е. перпендикулярно длинной оси двойной спирали [100].

На рисунке 16 показана модель комплексов ДНК с антрациклиновыми антибиотиками [100]. Согласно этой модели хромофор антибиотика встраивается между парами оснований ДНК со стороны узкой бороздки двойной спирали (рис. 16а). Стабилизация комплекса происходит за счёт межплоскостных (стекинг) взаимодействий планарной кольцевой системы антибиотика с основаниями ДНК, расположенными "выше" и "ниже" места интеркаляции, а также в результате электростатического взаимодействия положительно заряженной аминогруппы сахарного остатка антибиотика с отрицательно заряженной фосфатной группой молекулы ДНК. Длинная

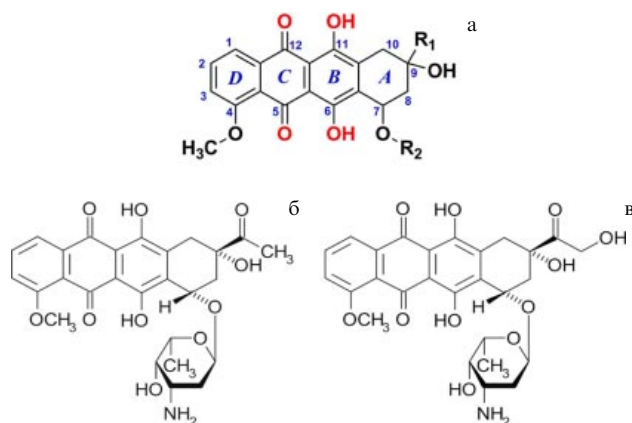


Рис. 15. Структура агликона антибиотиков антрациклиновой группы (а) и структурные формулы антрациклинов ДАУ (б) и ДОКС (в).

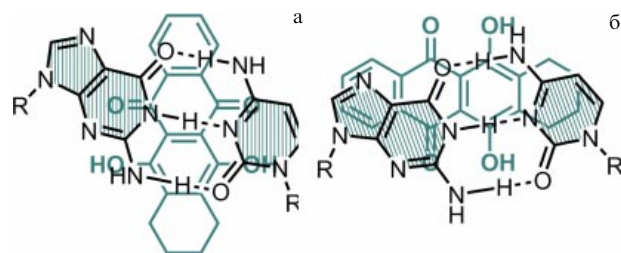


Рис. 16. Схематические изображения интеркаляционного (а) и "внешнего" (б) комплексов между агликонами антрациклинов и парами оснований ДЦ-молекулы ДНК (вид вдоль длинной оси спирали ДНК; пары оснований ДНК заштрихованы).

ось молекулы интеркалированного антибиотика оказывается при этом перпендикулярной линии, соединяющей соседние пары оснований ДНК в месте интеркаляции.

Таким образом, для образования интеркаляционного комплекса между антрациклиновыми антибиотиками и линейными ДЦ-молекулами ДНК необходимо, чтобы вторичная структура ДНК соответствовала физико-химическим параметрам В-формы. Это связано с тем, что степень гидратации В-формы ДНК, расстояние между парами азотистых оснований и т.д. обеспечивают условия для раскручивания двойной спирали и удлинения молекулы ДНК, что необходимо для встраивания молекулы интеркалятора между парами азотистых оснований.

Антрациклиновые антибиотики способны образовывать также неинтеркаляционные ("внешние") комплексы с одноцепочечными полинуклеотидами [106], полифосфатами, а также с денатурированной ДНК [107], однако по прочности такие комплексы значительно уступают комплексам, образуемым этими антибиотиками с ДЦ-молекулами ДНК. Анализ констант связывания антрациклиновых антибиотиков с В-формой ДНК [108, 109] подтвердил гипотезу об образовании "внешнего" комплекса с более низкой константой связывания, чем у классического интеркаляционного комплекса.

Предположительная структура внешнего комплекса показана на рис. 16б. Двухцепочечная РНК и полинуклеотиды, вторичная структура которых характеризуется А-формой, не образуют интеркаляционных комплексов с антрациклиновыми антибиотиками [109, 110]. Тем не менее для этих нуклеиновых кислот характерно "внешнее" связывание антрациклинов за счёт электростатического взаимодействия положительно заряженного аминосахара антибиотика и отрицательно заряженной фосфатной группы нуклеиновой кислоты [112].

Таким образом, приведённые выше данные показывают, что в зависимости от условий (природа нуклеиновой кислоты, ионная сила, степень заполнения полимера лигандом) молекулы антрациклиновых антибиотиков образуют либо интеркаляционные, либо внешние комплексы с ДЦ-молекулами нуклеиновых кислот; причём молекулы антибиотика занимают определённое фиксированное положение на этих молекулах.

Важно отметить, что в случае образования интеркаляционного комплекса с молекулами ДЦ ДНК атомы кислорода в положениях 5, 6 или 11, 12 антрациклиновых антибиотиков становятся практически недоступными для химических реакций (в частности, для реакции хелатообразования), тогда как при образовании внешнего комплекса с молекулами как ДЦ ДНК, так и ДЦ РНК эти атомы кислорода антибиотика могут принимать участие в различных химических реакциях.

С учётом приведённых выше литературных данных частицы дисперсий, полученных при фазовом исключении молекул ДНК из водно-солевых растворов с разной концентрацией ПЭГ, были обработаны антрациклиновым антибиотиком — доксорубицином (ДОКС). В качестве контроля была использована дисперсия "классического" холестерика, образующаяся при фазовом исключении молекул ДНК из водно-солевого раствора ПЭГ с концентрацией 170 мг мл⁻¹.

На рисунке 17 (кривая 1) для сравнения показан спектр КД холестерической дисперсии (после термического тренинга, $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл⁻¹), частицы которой сформированы из молекул ДНК и затем обработаны ДОКС. В полном соответствии с теорией [85] в видимой области спектра КД в полосе поглощения ДОКС появляется дополнительная полоса, отрицательный знак ко-

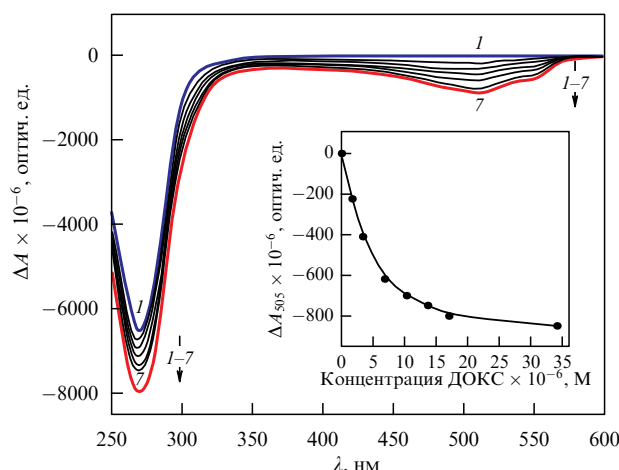


Рис. 17. Спектр КД холестерической дисперсии ДНК, обработанной ДОКС. Кривая 1 — спектр КД исходной холестерической дисперсии, нагретой от 22°С до 80°С и охлаждённой до комнатной температуры (22°С). Кривые 2–7 — спектры КД после обработки холестерической дисперсии ДОКС: 2 — $C_{\text{DOX}} = 1,72 \times 10^{-6}$ М, 3 — $C_{\text{DOX}} = 3,44 \times 10^{-6}$ М, 4 — $C_{\text{DOX}} = 5,17 \times 10^{-6}$ М, 5 — $C_{\text{DOX}} = 6,12 \times 10^{-6}$ М, 6 — $C_{\text{DOX}} = 17,18 \times 10^{-6}$ М, 7 — $C_{\text{DOX}} = 34,14 \times 10^{-6}$ М. $C_{\text{DNA}} = 10$ мкг мл⁻¹, $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл⁻¹, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na⁺-фосфатный буфер, $L = 1$ см. На вставке: зависимость амплитуды полосы в спектре КД ($\lambda = 505$ нм) дисперсии ДНК с холестерической упаковкой молекул в частицах ($C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл⁻¹), обработанных ДОКС, от концентрации ДОКС, $L = 1$ см.

торой совпадает со знаком полосы в области поглощения азотистых оснований ДНК. Появление такой дополнительной полосы в спектре КД означает, что молекулы ДОКС не только взаимодействуют с молекулами ДНК, но встраиваются (интеркалируют) между парами азотистых оснований ДНК [34]. Угол наклона молекул ДОКС практически совпадает с углом наклона азотистых оснований ДНК по отношению к оси холестерической структуры частиц дисперсии.

На вставке рис. 17 приведена зависимость амплитуды отрицательной полосы в спектре КД холестерических частиц ДНК в области поглощения ДОКС от концентрации ДОКС в растворе. Эта зависимость показывает, что молекулы ДОКС взаимодействуют с молекулами ДНК до полного насыщения молекул ДНК антрациклином.

Приведённые на рис. 17 изменения спектра КД дисперсии как в области поглощения хромофоров ДНК, так и в области поглощения хромофоров соединения, интеркалирующего между парами азотистых оснований, характерны для холестерических структур, сохраняющих параметры В-формы.

На рисунке 18 приведён спектр КД дисперсии ДНК, частицы которой, имеющие "возвратную" холестерическую структуру ($C_{\text{PEG}} = 240$ мг мл⁻¹), также были обработаны ДОКС. Эту дисперсию получали из частиц с гексагональной упаковкой молекул ДНК в результате их нагревания до 80°С и охлаждения до 22°С. Такой процесс приводил, как показано выше, к появлению аномальной полосы в спектре КД, соответствующей формированию возвратной холестерической структуры.

Обращает на себя внимание несколько фактов.

Во-первых, в случае дисперсии, частицы которой имеют "возвратную" структуру, амплитуда полосы в области поглощения азотистых оснований заметно превышает значение, характерное для классического холестерика, сформированного при $C_{\text{PEG}} = 170$ мг мл⁻¹ (см. рис. 17).

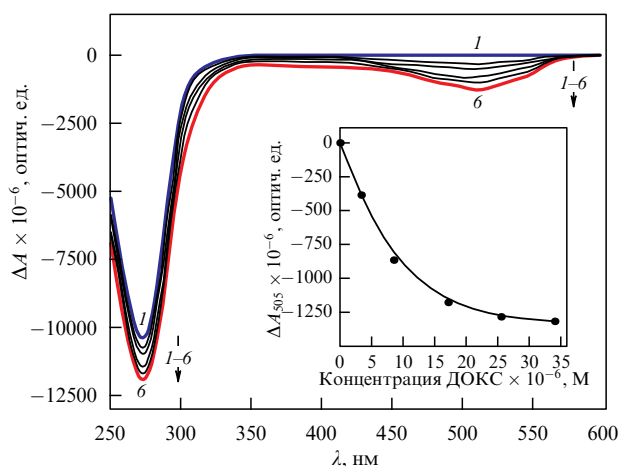


Рис. 18. Спектры КД дисперсии возвратной холестерической фазы ДНК, обработанной ДОКС: кривая 1 — спектр КД дисперсии исходной возвратной фазы, полученной при нагревании до 80°C и охлаждении до 22°C дисперсии с гексагональной упаковкой молекул, кривые 2–6 — спектры КД после обработки возвратной фазы ДОКС: 2 — $C_{\text{DOX}} = 1,72 \times 10^{-6}$ М, 3 — $C_{\text{DOX}} = 3,44 \times 10^{-6}$ М, 4 — $C_{\text{DOX}} = 6,89 \times 10^{-6}$ М, 5 — $C_{\text{DOX}} = 13,74 \times 10^{-6}$ М, 6 — $C_{\text{DOX}} = 34,14 \times 10^{-6}$ М, $C_{\text{DNA}} = 10$ мкг мл⁻¹, $C_{\text{PEG}} = 240$ мг мл⁻¹, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na⁺-фосфатный буфер. $L = 1$ см. На вставке: зависимость амплитуды полосы в спектре КД ($\lambda = 505$ нм) частиц ДНК с возвратной холестерической структурой ($C_{\text{PEG}} = 240$ мг мл⁻¹), обработанных ДОКС, от концентрации ДОКС, $L = 1$ см.

Во-вторых, в полосе поглощения ДОКС в видимой области спектра КД дисперсии, частицы которой имеют возвратную холестерическую структуру, появляется дополнительная полоса, отрицательный знак которой совпадает со знаком полосы в области поглощения азотистых оснований ДНК. Появление такой дополнительной полосы означает, что молекулы ДОКС взаимодействуют с молекулами ДНК. Причём большей величине амплитуды полосы в области поглощения хромофоров ДНК соответствует более высокое значение равновесной амплитуды полосы при $\lambda = 505$ нм.

В-третьих, зависимость отрицательной полосы в спектре КД в области поглощения ДОКС у частиц с возвратной холестерической структурой (см. вставку на рис. 18) от концентрации ДОКС показывает, что эти молекулы могут встраиваться (интеркалировать) между парами азотистых оснований молекул ДНК до полного насыщения молекул ДНК антрациклином.

Надо иметь в виду, что, согласно результатам рентгенографического анализа [40], увеличение осмотического давления ПЭГ приводит к заметному уменьшению среднего расстояния между молекулами ДНК в образованной структуре. Такое уменьшение расстояния между молекулами ДНК должно, согласно теории [88], приводить к увеличению амплитуды аномальной полосы в спектре КД холестерической дисперсии молекул ДНК.

На рисунке 19 сопоставлены результаты теоретических расчётов для двух условных дисперсий ДНК с холестерической упаковкой молекул, различающиеся своими параметрами. Как видно, уменьшение среднего расстояния между молекулами ДНК, образующими холестерическую структуру, от 35 до 25 Å приводит к заметному возрастанию амплитуды аномальной полосы в спектре КД. Исходя из рис. 19 можно утверждать, что уменьшение расстояния между молекулами ДНК в частицах дисперсии (при неизменности остальных параметров вторичной структуры этих молекул) за счёт возрастания осмотического давления ПЭГ должно сопровождаться увеличением амплитуды аномальной полосы в спектре КД.

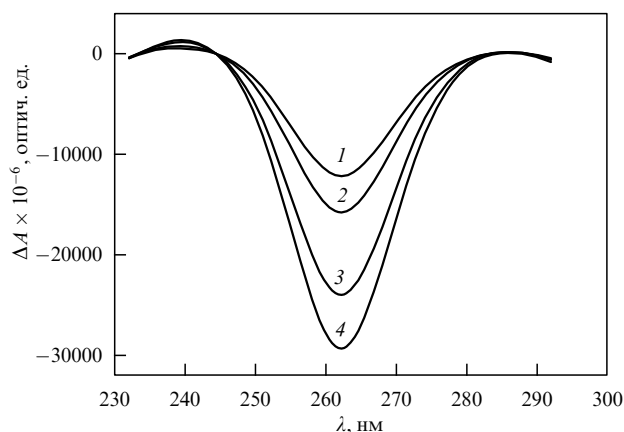


Рис. 19. Теоретически рассчитанные спектры КД двух условных холестериков ДНК, различающихся средним расстоянием d между квазинематическими слоями и углом φ закрутки этих слоёв: 1 — $d = 3,5$ нм, $\varphi = 0,5^\circ$, 2 — $d = 2,5$ нм, $\varphi = 0,5^\circ$, 3 — $d = 2,5$ нм, $\varphi = 1,0^\circ$, 4 — $d = 2,5$ нм, $\varphi = 1,5^\circ$. $C_{\text{DNA}} = 30$ мкг мл⁻¹, $L = 1$ см.

тания осмотического давления ПЭГ должно сопровождаться увеличением амплитуды аномальной полосы в спектре КД.

Сопоставление рис. 18 и 19 показывает, что оптические свойства возвратной структуры даже превышают аналогичные параметры исходного холестерика. Поскольку при неизменной вторичной структуре молекул ДНК между полосой в спектре КД, расположенной в области хромофоров ДНК, и полосой в области поглощения хромофоров антибиотика существует корреляция [88], увеличение полосы в области поглощения хромофоров ДНК будет сопровождаться ростом аналогичной полосы в области поглощения хромофоров антибиотика в видимой области спектра КД. Такая корреляция возможна только в случае сохранения параметров В-формы молекул ДНК, что необходимо для интеркаляции ДОКС. Таким образом, имеющие возвратную холестерическую структуру частицы дисперсии, образованные из частиц с гексагональной упаковкой молекул ДНК при $C_{\text{PEG}} = 240$ мг мл⁻¹, сохраняют неизменными параметры В-формы молекул ДНК. Дальнейшее увеличение концентрации ПЭГ сопровождается изменением свойств возвратных холестерических структур.

На рисунке 20 приведены зависимости амплитуды полосы в спектре КД дисперсий в области поглощения хромофоров ДОКС от его концентрации в растворе. Эти дисперсии сформированы при разных концентрациях ПЭГ.

При анализе данных, приведённых на рис. 20, можно отметить следующее.

Во-первых, при возрастании концентрации ПЭГ от 170 до 240 мг мл⁻¹ амплитуда полосы в области поглощения хромофоров ДОКС увеличивается. Такое увеличение вполне соответствует теоретическому представлению о том, что возрастание осмотического давления ПЭГ сопровождается уменьшением расстояния между молекулами ДНК в частицах дисперсии и соответствующим возрастанием амплитуды аномальной полосы (см. рис. 19). При этом существует корреляция между увеличением амплитуды полосы в области поглощения хромофоров ДНК и в области поглощения хромофоров соединения, интеркалирующего между парами оснований ДНК (при неизменности вторичной структуры ДНК). Поэтому рост полосы в спектре КД в области поглощения ДОКС (см. рис. 20, кривые 1–5) отражает лишь

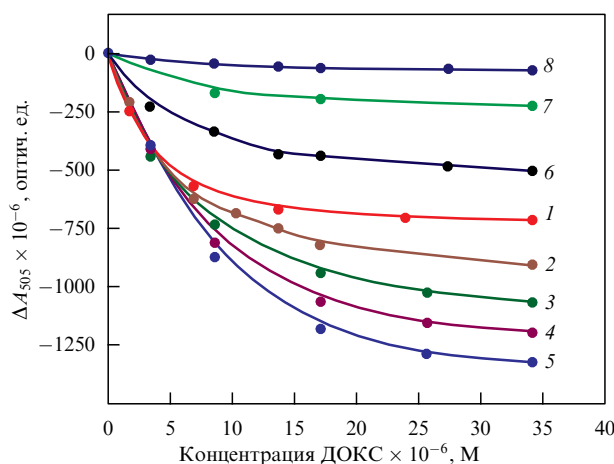


Рис. 20. Зависимости амплитуды полосы в спектре КД ($\lambda = 505$ нм) для частиц дисперсий ДНК с холестерической и возвратной холестерической структурой, обработанных ДОКС, от концентрации ДОКС: 1 — $C_{PEG} = 170$ мг $мл^{-1}$, 2 — $C_{PEG} = 180$ мг $мл^{-1}$, 3 — $C_{PEG} = 200$ мг $мл^{-1}$, 4 — $C_{PEG} = 220$ мг $мл^{-1}$, 5 — $C_{PEG} = 240$ мг $мл^{-1}$, 6 — $C_{PEG} = 260$ мг $мл^{-1}$, 7 — $C_{PEG} = 270$ мг $мл^{-1}$, 8 — $C_{PEG} = 280$ мг $мл^{-1}$. $C_{DNA} = 10$ мкг $мл^{-1}$, 0,3 М NaCl + 0,002 М Na^+ -фосфатный буфер, $L = 1$ см.

уменьшение расстояния между молекулами ДНК в образующихся частицах дисперсии, имеющих возвратную холестерическую структуру. В таких частицах В-форма молекул ДНК сохраняется.

Во-вторых, увеличение концентрации ПЭГ до 280 мг $мл^{-1}$ сопровождается дополнительным уменьшением среднего расстояния между молекулами ДНК в частицах дисперсий с гексагональной упаковкой молекул [40]. Не исключено, что в таких условиях свойства самих квазинематических слоёв начинают меняться. Это приводит к резкому уменьшению амплитуды аномальной отрицательной полосы ($\lambda = 270$ нм) в спектре КД как дисперсий, образованных из таких частиц, так и дисперсий, имеющих возвратную холестерическую структуру [94].

Поскольку между амплитудой аномальной полосы в области поглощения хромофоров ДНК и области поглощения хромофоров ДОКС существует корреляция, амплитуда полосы в области поглощения ДОКС также должна уменьшиться. Кроме того, при высокой плотности упаковки молекул ДНК в частицах дисперсий параметры вторичной структуры этих молекул начинают меняться, что сопровождается изменением свойств самих квазинематических слоёв. В указанных условиях корректная интеркаляция ДОКС между парами оснований ДНК и правильное размещение ДОКС в квазинематических слоях частиц дисперсий становятся невозможными.

Поэтому при обработке дисперсий с высокой плотностью упаковки молекул ДНК молекулами ДОКС форма полосы в спектре КД в области поглощения хромофоров ДОКС напоминает форму полосы в спектре КД, характерную для *линейной* молекулы ДНК, обработанной антрациклином [113]. Определить эффективность интеркаляции этого антрациклина между парами азотистых оснований ДНК (по величине малоинтенсивной полосы в спектре КД) становится крайне затруднительным.

Таким образом, данные, приведённые на рис. 20, позволяют предполагать, что в зависимости от среднего расстояния между молекулами ДНК в исходных частицах дисперсий с гексагональной упаковкой молекул их нагревание приводит к формированию как минимум

нескольких семейств частиц, которые различаются не только по способности к образованию "возвратных" холестерических структур, но и по способности к взаимодействию с антрациклиновыми интеркаляторами.

8. "Возвратные" холестерические структуры ДНК и критерий Линдемана

В 1910 г. Ф. Линдеман (F. Lindemann) предложил достаточно простую полуэмпирическую модель плавления кристаллических материалов [114]. Основное допущение Линдемана состоит в том, что у этих материалов появляется возможность перехода в новое структурное состояние, в случае когда амплитуда тепловых колебаний атомов, точнее величина среднеквадратичного смещения атомов, превышает некоторую относительно небольшую (порядка 0,1) долю расстояния между ближайшими соседями [115]. Эта доля получила название "число Линдемана" (L). Эмпирическая величина L для многих простых кристаллов составляет около 10 % межатомного расстояния [116]. В принципе величина числа Линдемана *a priori* неизвестна; она зависит от многих факторов, например межмолекулярного (или межатомного) взаимодействия, структуры и размерности системы [117, 118].

Само по себе число Линдемана ещё не позволяет предсказать свойства новой фазы, образующейся при выполнении критерия Линдемана.

Применительно к нашему случаю следует отметить, что теории плавления гексагональной фазы, образованной полужёсткими молекулами ДНК, практически не существует. Важная работа в этом направлении была выполнена Т. Одижком [65, 66], который предполагал, что при гексагональной упаковке молекул ДНК в квазинематических слоях эти молекулы параллельны друг другу (рис. 21). При определённых условиях, в пределе, при относительно незначительных флуктуациях гексагональной структуры, т.е. при $u \ll D$ [66], фазовое состояние показанной выше структуры может измениться и, согласно полуэмпирическому критерию Линдемана:

$$\frac{u_m}{D_m} = L$$

(индекс m означает, что равенство имеет место на кривой плавления гексагональной фазы ДНК и может возникнуть новая фаза).

Для такой трансформации гексагональной структуры известны оценки числа Линдемана, полученные разными авторами в результате экспериментальных исследований и теоретических расчётов. Величина $L = 0,122$ [66] (следует отметить, что гексагональная фаза ДНК в слоте [66] существовала при расстоянии между молекулами 4,8 нм, что не согласуется с известными литературными данными [20, 35, 46]: $L = 0,73$ [119], $L = 0,48$ [120], $L = 0,13-0,18$ [121], $L = 0,098 \pm 0,003$ [14]).

Можно воспользоваться данными, приведёнными в работе [66], для оценки числа Линдемана по величине модуля нематического ориентационного параметра порядка (S). Согласно этим данным $L = (1 - S)^{1/2}$. С учётом того, что в случае жидких кристаллов, образованных разными ДЦ-молекулами нуклеиновых кислот, параметр порядка составляет 0,6–0,8 [92], величина L лежит в пределах 0,16–0,04, что вполне соответствует приведённым выше оценкам.

Оценки числа Линдемана существенным образом зависят от точности определения расстояния между ближайшими соседями (т.е. от величины D) и от молекулярных характеристик.

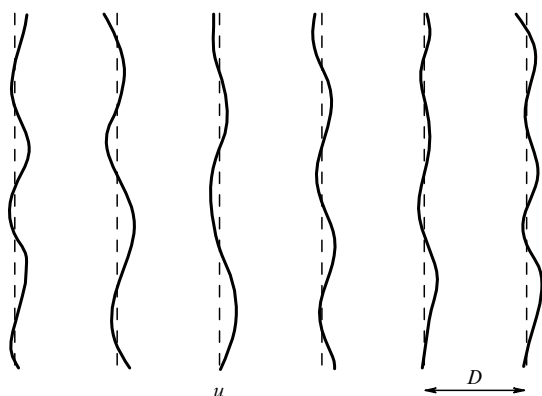


Рис. 21. Схематическое двумерное изображение "квазинематического" слоя, образованного слабо флуктуирующими полугибкими молекулами ДНК. D — среднее расстояние между соседними молекулами ДНК, u — амплитуда изгибных термофлуктуационных смещений молекул ДНК в слое.

При нагревании обычной кристаллической структуры амплитуды молекулярных термофлуктуационных смещений (u) увеличиваются. Когда величина среднеквадратичных смещений $\langle u^2 \rangle$ становится порядка некоторой доли межмолекулярного расстояния l , система проявляет признаки жидкости [122–124].

Два важных добавления:

— как сказано выше, число Линдемана не является универсальной величиной; оно зависит от симметрии и размерности самой структуры и характеристик молекул, её образующих. В частности, как показано в цитированной выше работе Т. Одижка, число Линдемана существенно зависит от электростатического отталкивания, которое значительно модифицирует амплитуду молекулярных смещений;

— кристаллоподобное поведение (т.е. небольшие смещения относительно статистического положения равновесия) становится нестабильным и появляется возможность перехода в жидкость, когда амплитуды колебаний всё ещё намного меньше, чем среднее расстояние между молекулами.

Отметим, что аналогичный критерий структурных фазовых превращений может быть использован и для систем без дальнего кристаллического порядка. Критерий позволяет описывать и структурные изменения для систем с ближним трансляционным упорядочением (в которых расстояние l между молекулами сохраняется только в среднем).

Сказанное выше означает, что критерий можно применить в случае гексагональной упаковки молекул ДНК. В этом случае можно переформулировать классический критерий Линдемана как

$$\frac{\langle u^2(T_m) \rangle}{l^2} \approx 10^{-2}, \quad (1)$$

где T_m — температура плавления, условие, что потеря упругой энергии становится сравнимой с выигрышем в энтропии. Эта форма критерия Линдемана (с точностью до численных коэффициентов в расчёте на единицу объёма) может быть представлена в виде

$$\frac{1}{2} \lambda \frac{\langle u^2 \rangle}{l^2} \approx \frac{k_B T}{l^3}, \quad (2)$$

где λ — модуль Юнга, k_B — постоянная Больцмана.

Оба критерия, (1) и (2), эквивалентны.

Приведённые выше экспериментальные данные (см. рис. 14) можно качественно объяснить, используя такой обобщённый критерий Линдемана. Поскольку интерес представляет переход из гексагональной упаковки молекул ДНК в холестерическую, этот критерий необходимо модифицировать с учётом следующих факторов.

1. Гексагональная структура молекул ДНК (см. рис. 1) не является кристаллом с дальним трансляционным и ориентационным упорядочением. В этой структуре возможен только ближний трансляционный порядок в сочетании с нематикоподобным дальним ориентационным упорядочением.

2. В нашем случае мы не имеем дело с "полным" плавлением, т.е. с переходом молекул ДНК из гексагонального состояния в изотропное. Мы наблюдаем фазовый переход структуры с гексагональной упаковкой в структуру с дальним холестерикоподобным ориентационным порядком и ближним трансляционным упорядочением.

Преимущество формулы (2) состоит в том, что она может быть применена в нашем случае, т.е. для описания структурного перехода, наблюдаемого при нагревании частиц ЖКД с гексагональной упаковкой молекул ДНК.

Нужны лишь две модификации уравнения (2):

а) в холестерической структуре сохраняется дальний ориентационный порядок (хотя структура закручена), тогда как в изотропной структуре таковой отсутствует. Таким образом, выигрыш в энтропии при переходе от гексагональной структуры к холестерической меньше, чем при полном плавлении гексагональной структуры;

б) однако существует дополнительный выигрыш в ориентационной упругой энергии Франка, поскольку в нематикоподобной упорядоченной гексагональной структуре ориентационная упругая энергия Франка больше, чем в закрученной холестерической структуре. Эта энергия (на единицу объёма) выражается как

$$\Delta E_{Fr} \approx \frac{1}{2} K_{22} q_0^2, \quad (3)$$

где K_{22} — константа упругости Франка, $q_0 = \pi/P$ (P — шаг холестерической спиральной структуры).

Применение модифицированного (см. выше) подхода Линдемана для случая частиц ЖКД ДНК означает, что при некоторой температуре ПЭГ-содержащего раствора амплитуда смещений и вращательной диффузии соседних ДЦ-молекул ДНК в гексагональной фазе (гексагональной структуре (см. рис. 1) достигает критического значения. Гексагональная упаковка становится подвижной, и в отсутствие других внешних факторов система стремится перейти в изотропное состояние.

Однако в нашем случае переход линейных ДНК в изотропное состояние и их сворачивание в изолированные статистические клубки невозможны по стерическим причинам (осмотическое сжатие системы за счёт ПЭГ) [54, 55]. При постоянном осмотическом давлении пространственная структура частиц дисперсии ДНК, определяемая концентрацией ПЭГ, оказывается практически "замороженной". Следовательно, можно ожидать, что вместо полного "плавления" гексагональной структуры может произойти другой фазовый переход. В отличие от изотропной структуры, даже при относительно высоком осмотическом давлении ПЭГ может возникнуть новая стабильная пространственная спирально закрученная структура и фазовый переход произойдёт раньше установления гипотетической (недостижимой) температуры "плавления".

Физическая причина такого неполного "плавления" состоит в том, что частичная потеря ориентационной эн-

тропии (вследствие перехода в упорядоченную спирально закрученную, холестерическую, структуру) компенсируется за счёт вклада в свободную энергию, связанного с ориентационной упругостью хиральных молекул ДНК. Действительно, так как сами молекулы ДНК (и основные силы взаимодействия между ними) являются нецентросимметричными (хиральными), их параллельное упорядочение невыгодно в терминах ориентационной упругой энергии Франка. При параллельной (нематикоподобной) ориентации хиральных молекул ДНК система проигрывает в ориентационной упругой энергии кручения, определяемой константой упругости Франка K_{22} и шагом P оптимальной холестерической упаковки хиральных молекул.

Поэтому при нагревании частиц ЖКД с гексагональной упаковкой соседних квазинематических слоёв из ДЦ-молекул ДНК при температуре ниже гипотетической (недостижимой) температуры "плавления" даже при относительно высоком осмотическом давлении ПЭГ может возникнуть новая стабильная спирально закрученная, холестерическая, пространственная структура. Такая структура была названа возвратной холестерической, а фазовый переход — переходом из гексагональной упаковки в возвратную холестерическую упаковку молекул ДНК в пределах частиц ЖКД [40]. (Можно добавить, что рассмотренная модель температурно-индуцированного фазового перехода гексагональная упаковка → холестерическая упаковка в случае частиц ЖКД ДНК в принципе имеет некоторое сходство с фазовым переходом гексагональная упаковка → холестерическая упаковка в результате закрутки холестерических доменов в макроскопической ЖК-фазе, вызванной изменением концентрации [10]).

Простейшая иллюстрация наблюдаемых оптических эффектов основана на учёте теоретических результатов, описывающих образование холестерической фазы из молекул ДНК [62, 125]. Авторы предложили использовать триады из линейных молекул ДНК (рис. 22) в качестве строительных блоков, определяющих свойства этой фазы. Применение такой модели для случая частиц ЖКД ДНК позволяет нам рассмотреть следующий сценарий перехода гексагональная структура → холестерическая структура.

Предположим, что в стабильной гексагональной структуре, показанной на рис. 1, молекулы ДНК действительно образуют квазинематические слои. Условно обозначим два соседних слоя как слой А и слой Б. Первоначально молекулы ДНК в этих слоях имеют гексагональную упаковку. В принципе при увеличении температуры раствора должно произойти "плавление" гексагональной структуры и молекулы ДНК должны перейти в изотропное состояние. Однако применение критерия Линдемана позволяет рассмотреть совсем другую возможность. При нагревании, в условиях повышенной диффузионной подвижности молекул ДНК и пониженного осмотического давления раствора ПЭГ, появляется возможность флуктуационного смещения соседних молекул 1 и 2 (слой А) и усиления их латерального взаимодействия, сопровождаемого их фиксацией на определённом расстоянии в плоскости (в одном квазинематическом слое). Образуется ансамбль из этих молекул. Если молекулы $1_k, 1_l$ или $2_x, 2_y$ и т.д. из той же плоскости приближаются к ансамблю, то это приводит лишь к увеличению размера первоначального ансамбля. В данных условиях молекула 3 (соседнего слоя Б) должна "чувствовать" хиральность пространственной формы не каждой молекулы 1 или 2 отдельно (как это было при исходной гексагональной упаковке), а объединённую хиральность ансамбля из

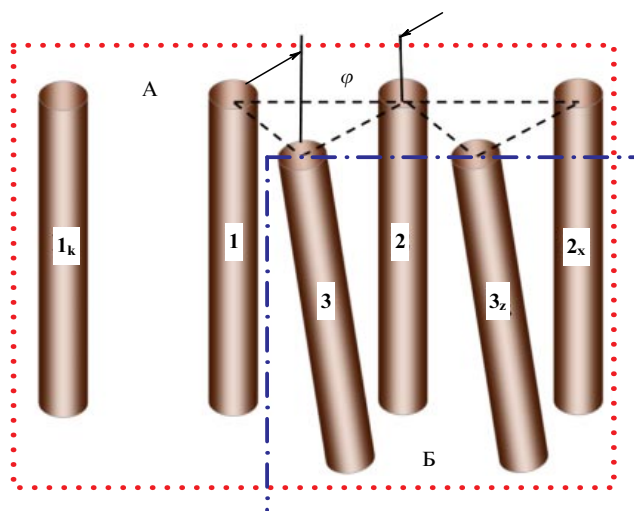


Рис. 22. (В цвете онлайн.) Схематическое изображение "триады". "Триада" представляет собой комбинацию из двух молекул ДНК (1 и 2), расположенных в одном "слое" (слой А, показан красной пунктирной линией), и третьей молекулы ДНК (3), повернутой на угол φ в параллельном "слое" (слой Б, показан синей штрих-пунктирной линией).

молекул 1 и 2, которая должна отличаться от хиральности исходных молекул.

Если первоначально между молекулами 1 и 2 отсутствовала "закручивающая" сила, то при взаимодействии с молекулой 3 может возникнуть определённый угол закрутки молекул, который приобретает важное значение [66, 73]. В результате изменения характера взаимодействия между молекулой 3 и хиральным ансамблем из молекул 1 и 2 произойдёт поворот молекулы 3 в пространстве [34, 126]. Возникает триадная структура (см. рис. 22), которая станет основой для формирования зародыша (ядра) новой фазы.

Последующий поворот всего слоя Б, а следовательно, и соседних квазинематических слоёв приводит к росту зародыша до критического размера, необходимого для формирования новой фазы из метастабильной гексагональной фазы. (В принципе рост критического зародыша за счёт диффузии соседних слоёв может и не требовать дополнительных термоактивационных процессов.) Возникающая новая спирально закрученная фаза будет представлять собой холестерик ДНК и обладать аномальной оптической активностью.

Рассмотренный "триадный" механизм в сочетании с различиями между кривыми, приведёнными на рис. 14, свидетельствует о дуализме действия температуры. Критерий Линдемана позволяет нам говорить, что имеется ещё один фактор (помимо осмотического давления раствора), а именно температура, которая определяет формирование частиц ЖКД с различными способами упаковки молекул ДНК. С одной стороны, температура вызывает образование зародыша новой фазы и его рост. С другой стороны, температура увеличивает флуктуации соседних квазинематических слоёв и препятствует их упорядоченному пространственному расположению в структуре частиц дисперсии. Поэтому лишь при понижении температуры, когда возрастает осмотическое давление раствора, "сжимающее" соседние молекулы и слои ДНК, когда уменьшается диффузионная подвижность молекул ДНК, должно наблюдаться не только точное пространственное упорядочение квазинематических слоёв из молекул ДНК, но и их "замораживание" в пределах вновь

сформированной холестерической структуры. Это означает, что при понижении температуры переход в исходную гексагональную структуру становится практически невозможным как по кинетическим соображениям, так и в связи с изменением характера взаимодействия между соседними молекулами ДНК.

Результаты, приведённые на рис. 14, можно рассматривать как подтверждение высказанной гипотезы. Действительно, этот рисунок показывает, что понижение температуры ЖКД приводит к заметному росту аномальной полосы в спектре КД, расположенной в области поглощения азотистых оснований ДНК. Также можно обратить внимание на следующее. Если при комнатной температуре вязкость (концентрация) раствора ПЭГ такова, что при ней обеспечивается высокая скорость диффузии соседних молекул ДНК, то "сжимающее" осмотическое давление будет не только приводить к латеральному взаимодействию соседних молекул 1 и 2, но и обеспечивать поворотное смещение молекулы 3 (см. рис. 22). При этих условиях будет возникать пространственно закрученная (холестерическая) структура частиц дисперсии ДНК (с расстоянием между молекулами ДНК от 50 до 30 Å) [20, 35, 46]. Однако при увеличении вязкости раствора ПЭГ (т.е. при увеличении осмотического давления), когда скорость диффузии молекул ДНК убывает, осмотическое давление будет обеспечивать только латеральное взаимодействие соседних молекул 1, 2 и 3. В этих условиях при комнатной температуре угол ϕ (см. рис. 22) между квазинематическими слоями будет стремиться к нулевому значению и при обращении ϕ в нуль будет реализовываться гексагональная упаковка молекул ДНК.

Следовательно, существуют условия, при которых анизотропные и хиральные свойства молекул ДНК не обеспечивают достаточного вклада в свободную энергию взаимодействия молекул ДНК и реализуется их гексагональная упаковка в частицах ЖКД. Другими словами, энтропия упаковки жёстких линейных ДЦ-молекул ДНК будет превышать энергетический вклад, обусловленный их хиральными свойствами [73]. Однако ситуация меняется при изменении температуры. Наши результаты показывают, что чем выше температура ПЭГ-содержащего раствора, тем сильнее тенденция квазинематических слоёв, образованных хиральными молекулами ДНК, к холестерической, а не к гексагональной упаковке.

9. Заключение

Обобщены и систематизированы результаты экспериментальных и теоретических исследований свойств ЖКД ДНК, образующихся при фазовом исключении этих молекул из воднополимерных растворов. В рамках представления о квазинематических слоях из ориентационно упорядоченных молекул ДНК в частицах ЖКД с учётом критерия Линдемана проанализировано влияние температуры на структуру этих частиц. Даже небольшие термически индуцированные изгибные флуктуации молекул ДНК могут приводить к фазовому переходу в холестерикоподобную структуру (с неоднородной пространственной закруткой). Кроме того, такие изгибные флуктуации могут существенно увеличивать энергию межмолекулярного электростатического отталкивания (просто благодаря флуктуационному сближению зарядов), что также уменьшает область стабильности нематикоподобной ориентационной структуры гексагональной фазы. Нагревание частиц дисперсий с гексагональной упаковки молекул ДНК приводит к изменению пространственной ориентации соседних квазинематиче-

ских слоёв и сопровождается новым фазовым переходом: гексагональная упаковка молекул ДНК $\rightarrow$ возвратная холестерическая упаковка молекул ДНК. Возвратная холестерическая фаза имеет аномальные физико-химические свойства (оптические и текстурографические).

Множественность структурных форм новых возвратных холестерических структур зависит от характеристик самих молекул ДНК (среднее расстояние между молекулами в частицах дисперсий, нуклеотидный состав и молекулярная масса), от осмотического давления ПЭГ и температуры раствора и проявляется, в частности, в разной способности к взаимодействию с интеркалирующими соединениями (антрациклинами). Представление о существовании возвратных холестерических структур ДНК должно учитываться при рассмотрении свойств термотропных микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Ю.М.Е., С.Г.С. и В.И.С. Российским научным фондом (проект № 16-15-00041-П).

Список литературы

1. Robinson C *Tetrahedron* **13** 219 (1961)
2. Luzzati V, Nicolaïeff A *J. Mol. Biol.* **7** 142 (1963)
3. Potaman V N et al. *Nucleic Acids Res.* **9** 55 (1981)
4. Brandes R, Kearns D R *Biochemistry* **25** 5890 (1986)
5. Strzelecka T E, Rill R L *J. Am. Chem. Soc.* **109** 4513 (1987)
6. Livolant F et al. *Nature* **339** 724 (1989)
7. Wissenburg P et al. *Macromolecules* **28** 2315 (1995)
8. Parsegian V A et al. *Meth. Enzymology* **127** 400 (1986)
9. Todd B A et al. *Biophys. J.* **94** 4775 (2008)
10. Livolant F, Bouligand Y *J. Phys. France* **47** 1813 (1986)
11. Yevdokimov Yu M, Skuridin S G, Salyanov V I *Liq. Cryst.* **3** 1443 (1988)
12. Singh S *Phys. Rep.* **324** 107 (2000)
13. Merchant K, Rill R L *Macromolecules* **27** 2365 (1994)
14. Kassapidou K et al. *Biopolymers* **46** 31 (1998)
15. Rill R L et al. *Chromosoma* **98** 280 (1989)
16. Livolant F *J. Mol. Biol.* **218** 165 (1991)
17. Leforestier A, Livolant F *Biol. Cell* **71** 115 (1991)
18. Durand D, Doucet J, Livolant F *J. Phys. II France* **2** 1769 (1992)
19. Leforestier A, Livolant F *Biophys. J.* **65** 56 (1993)
20. Livolant F, Leforestier A *Prog. Polym. Sci.* **21** 1115 (1996)
21. Mitov M *Soft Matter* **13** 4176 (2017)
22. Lerman L S *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** 1886 (1971)
23. Yevdokimov Yu M et al. *FEBS Lett.* **23** 180 (1972)
24. Akimenko N M et al. *FEBS Lett.* **38** 61 (1973)
25. Maniatis T, Venable J H, Lerman L S *J. Mol. Biol.* **84** 37 (1974)
26. Lerman L S *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38** 59 (1974)
27. Поглазов Б Ф, Тихоненко А С, Энгельгардт В А *ДАН СССР* **143** 1233 (1962); Poglazov B F, Tikhonenko A S, Engelhardt V A *Proc. USSR Acad. Sci.* **145** 450 (1962)
28. Laemmli U K *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** 4288 (1975)
29. Hud N V, Vilfan I D *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34** 295 (2005)
30. Hoang T X et al. *J. Chem. Phys.* **140** 064902 (2014)
31. Yevdokimov Yu M, Skuridin S G, Lortkipanidze G B *Liq. Cryst.* **12** 1 (1992)
32. Goldar A, Thomson H, Seddon J M *J. Phys. Condens. Matter* **20** 035102 (2007)
33. Biswas N et al. *Chem. Phys. Lett.* **539–540** 157 (2012)
34. Yevdokimov Yu et al. *Crystals* **9** 162 (2019)
35. Livolant F *Physica A* **176** 117 (1991)
36. Евдокимов Ю М, Компанец О Н *УФН* **184** 665 (2014); Yevdokimov Yu M, Kompanets O N *Phys. Usp.* **57** 615 (2014)
37. Adamczyk A *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Incorpor. Nonlin. Opt.* **170** 53 (1989)
38. Арансон И С *УФН* **183** 87 (2013); Aranson I S *Phys. Usp.* **56** 79 (2013)
39. Евдокимов Ю М и др. *ДАН* **467** 556 (2016); Yevdokimov Yu M et al. *Dokl. Phys. Chem.* **467** 53 (2016)
40. Yevdokimov Yu M et al. *J. Biol. Phys.* **43** 45 (2017)
41. Евдокимов Ю М и др. *Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК* (М.: Радиотехника, 2008); Yevdokimov Yu M et al. *DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanoconstructions* (Boca Raton, FL: CRC Press. Taylor and Francis Group, 2011)

42. Yevdokimov Yu M et al., in *Structural DNA Nanotechnology: Liquid-Crystalline Approach* (Biotechnology Vol. 4 Applied Synthetic Biology, Ed. J N Govil) (Houston, TX: Studium Press, 2014) p. 327
43. Евдокимов Ю М и др. *Технол. живых систем* **10** (1) 20 (2013)
44. Strey H H, Parsegian V A, Podgornik R *Phys. Rev. Lett.* **78** 895 (1997)
45. Leonard M et al. *Polymer* **42** 5823 (2001)
46. Cherstvy A G *J. Phys. Chem. B* **112** 12585 (2008)
47. Hoang T X et al. *J. Chem. Phys.* **140** 064902 (2014)
48. Podgornik R et al. *Biophys. Chem.* **57** 111 (1995)
49. Odijk T *Biophys. Chem.* **73** 23 (1998)
50. Stanley C B, Hong H, Strey H H *Biophys. J.* **89** 2552 (2005)
51. Yasar S et al. *Sci. Rep.* **4** 6877 (2014)
52. Goldar A, Thomson H, Seddon J M *J. Phys. Condens. Matter* **20** 035102 (2007)
53. Ubbink J, Odijk T *Biophys. J.* **68** 54 (1995)
54. Grasso D et al. *Liq. Cryst.* **9** 299 (1991)
55. Grasso D, Gabriele-Campisi R, La Rosa C *Thermochim. Acta* **199** 239 (1992)
56. Skuridin S et al. *Liq. Cryst.* **3** 51 (1988)
57. Durand D, Doucet J, Livolant F *J. Phys. II France* **2** 1769 (1992)
58. Gautier A et al. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **97** 10 (1986)
59. Barry E et al. *Phys. Rev. Lett.* **96** 018305 (2006)
60. Чилая Г С, Лиценский Л Н *УФН* **134** 279 (1981); Chilaya G S, Lisetskii L N *Sov. Phys. Usp.* **24** 496 (1981)
61. Chandrasekhar S *Liquid Crystals* 2nd ed. (Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1992)
62. Kornyshev A A, Leikin S, Malinin S V *Eur. Phys. J. E* **7** 83 (2002)
63. Blinov L M *Structure and Properties of Liquid Crystals* (Dordrecht: Springer, 2010)
64. Azároff L V *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **60** 73 (1980)
65. Odijk T *Biophys. Chem.* **46** 69 (1993)
66. Odijk T *Europhys. Lett.* **24** 177 (1993)
67. Podgornik R, Strey H H, Parsegian V A *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **3** 534 (1998)
68. Вайнштейн Б К *Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах* (М.: Изд-во АН СССР, 1963)
69. Vainshtein B K *Diffraction of X-Rays by Chain Molecules* (Amsterdam: Elsevier Publ. Co., 1966)
70. Kornyshev A A et al. *Phys. Rev. Lett.* **95** 148102 (2005)
71. Kamien R D, Selinger J V *J. Phys. Condens. Matter* **13** R1 (2001)
72. Lee D J, Wynveen A, Kornyshev A A *Phys. Rev. E* **70** 051913 (2004)
73. Harris A B, Kamien R D, Lubensky T C *Phys. Rev. Lett.* **78** 1476 (1997)
74. Tombolato F, Ferrarini A *J. Chem. Phys.* **122** 054908 (2005)
75. Saeva F D, Wysocki J J *Am. Chem. Soc.* **93** 5928 (1971)
76. Sackman E, Voss J *Chem. Phys. Lett.* **14** 528 (1972)
77. Saeva F D, Sharpe P E, Olin G R *J. Am. Chem. Soc.* **95** 7656 (1973)
78. Saeva F D, in *Liquid Crystals and Ordered Fluids* Vol. 2 (Eds J F Johnson, R S Porter) (New York: Plenum Press, 1974) p. 581
79. Holzwarth G, Holzwarth N A W *J. Opt. Soc. Am.* **63** 324 (1973)
80. Nordén B *Appl. Spectrosc. Rev.* **14** 157 (1978)
81. Spada G P, Brigidi P, Gottarelli G *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **14** 953 (1988)
82. Maestre M F, Reich C *Biochemistry* **19** 5214 (1980)
83. Livolant F, Maestre M F *Biochemistry* **27** 3056 (1988)
84. Livolant F *Eur. J. Cell Biol.* **33** 300 (1984)
85. Семёнов С В, Евдокимов Ю М *Биофизика* **60** 242 (2015); Semenov S V, Yevdokimov Yu M *Biophysics* **60** 188 (2015)
86. Yevdokimov Yu M et al. *Liq. Cryst. Their Appl.* **18** 64 (2018)
87. Belyakov V A et al. *Liq. Cryst.* **20** 777 (1996)
88. Yevdokimov Yu M et al. *The CD Spectra of Double-Stranded DNA Liquid-Crystalline Dispersions* (New York: Nova Science, 2011)
89. Brunner W C, Maestre M F *Biopolymers* **13** 345 (1974)
90. Сонин А С *Введение в физику жидких кристаллов* (М.: Наука, 1983)
91. Sundaresan N et al. *Macromol. Biosci.* **6** 27 (2006)
92. Евдокимов Ю М и др. *Оптика и спектроскоп.* **123** 64 (2017); Yevdokimov Yu M et al. *Opt. Spectrosc.* **123** 56 (2017)
93. Yevdokimov Yu M et al. *Chem. Phys. Lett.* **707** 154 (2018)
94. Yevdokimov Yu M et al. *Chem. Phys. Lett.* **717** 59 (2019)
95. Yevdokimov Yu et al. *Crystals* **9** 162 (2019)
96. Giannini G *Med. Chem. Rev. Online* **1** 47 (2004)
97. Marco D, Arcamone F, Zunino, in *Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents* (Antibiotics, Vol. 3, Eds J W Corcoran et al.) (Berlin: Springer-Verlag, 1975) p. 101
98. Neidle S, Taylor G *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Nucl. Acids Protein Synthesis* **479** 450 (1977)
99. Lober G et al. *Studia Biophys.* **71** 203 (1978)
100. Gabbay E J et al. *Biochemistry* **15** 2062 (1976)
101. Patel D J, Canuel L L *Eur. J. Biochem.* **90** 274 (1978)
102. Calendi E et al. *Biochem. Biophys. Acta* **103** 25 (1965)
103. Triebel H et al. *Stud. Biophys.* **81** 79 (1980)
104. Reinert K E *Nucleic Acids Res.* **11** 3411 (1983)
105. Fritzche H et al. *Biochemistry* **21** 3940 (1982)
106. Ward D C, Reich E, Goldberg I *Science* **149** 1259 (1965)
107. Barthalemy-Clavay V, Maurizot J-C, Sicard P J *Biochimie* **55** 859 (1973)
108. Plumbridge T W, Aarons L J, Brown J R *J. Pharm. Pharmacol.* **30** 69 (1978)
109. Blake A, Peacocke A R *Biopolymers* **6** 1225 (1968)
110. Plumbridge T W, Brown J R *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Nucleic Acids Protein Synth.* **479** 441 (1977)
111. Doscočil J, Frič I *FEBS Lett.* **37** 55 (1973)
112. Plumbridge T W, Brown J R *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Nucleic Acids Protein Synth.* **563** 181 (1979)
113. Захаров М А и др. *Биофизика* **50** 834 (2005); Zakharov M A et al. *Biophysics* **50** 721 (2005)
114. Lindemann F A *Phys. Z.* **14** 609 (1910)
115. Dash J G *Rev. Mod. Phys.* **71** 1737 (1999)
116. Buchenau U, Zorn R, Ramos M A *Phys. Rev. E* **90** 042312 (2014)
117. Guerra R E *Phys. Rev. Lett.* **124** 218001 (2020)
118. Vopson M M, Rogers N, Hepburn I, arXiv:2005.12912
119. Khokhlov A R, Semenov A N *Physica A* **108** 546 (1981)
120. Selinger J V, Bruinsma R F *Phys. Rev. A* **43** 2922 (1991)
121. Hansen J P, McDonald I R *Theory of Simple Liquids* 1st ed. (London: Academic Press, 1976)
122. Bedanov V M, Gadiyak G V, Lozovik Yu E *Phys. Lett. A* **109** 289 (1985)
123. Lawson A C *Philos. Mag.* **89** 1757 (2009)
124. Guardiola R, Navarro J J *J. Phys. Chem. A* **115** 6843 (2011)
125. Kornyshev A A et al. *Rev. Mod. Phys.* **79** 943 (2007)
126. Евдокимов Ю М и др. *Биофизика* **61** 421 (2016); Yevdokimov Yu M et al. *Biophysics* **61** 351 (2016)

Multiplicity of 're-entrant' cholesteric structures in DNA liquid-crystalline dispersions

Yu.M. Yevdokimov^(1,a), S.G. Skuridin⁽¹⁾, V.I. Salyanov⁽¹⁾, S.V. Semenov⁽²⁾, E.I. Kats⁽³⁾

⁽¹⁾ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, 119991 Moscow, Russian Federation

⁽²⁾ National Research Center 'Kurchatov Institute', pl. Akademika Kurchatova 1, 123182 Moscow, Russian Federation

⁽³⁾ Landau Institute for Theoretical Physics, Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Semenova 1, 142432 Chernogolovka, Moscow region, Russian Federation

E-mail: ^(a) yevdokim@eimb.ru

The results of investigations of the properties of liquid-crystalline dispersions of DNA molecules formed in their phase exclusion are systematized. The influence of temperature and osmotic pressure on the structure of these molecules has been elucidated in the framework of the concept of 'quasinematic' layers of orientationally ordered DNA molecules in dispersed particles. A new hexagonal → 're-entrant' cholesteric packing phase transition of DNA molecules discovered by the authors is described, taking into account the generalized Lindemann criterion. The multiplicity of the 're-entrant' phases and their structure are shown to depend on the characteristics of DNA and water-polymer solutions.

Keywords: DNA, liquid-crystalline dispersions, circular dichroism, textures, intercalators, 're-entrant' phases, Lindemann criterion

PACS numbers: 61.30.Eb, 64.70.M–, **82.70.–y**

Bibliography — 126 references

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **191** (9) 999 – 1015 (2021)

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2020.09.038843>

Received 23 June 2020, revised 22 July 2020

Physics – Uspekhi **64** (9) (2021)

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNe.2020.09.038843>