

УДК 577.323

ВЛИЯНИЕ ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В СИСТЕМЕ БРОМИСТЫЙ ЭТИДИЙ - ДНК**А.А. Герус, А.В. Фомин, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк,****Е.В. Духопельников, А.С. Хребтова, А.В. Зинченко****Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул.Ак.Проскуры, 12, г.Харьков, 61085***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул.Переяславская, 23, г.Харьков, 61015*

e-mail: k_berez@mail.ru

Поступила в редакцию 2 июля 2014 года

Принята 3 сентября 2014 года

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и спектрофотометрии (СФ) проведено исследование взаимодействия интеркалятора бромистого этидия (БЭ) с ДНК в присутствии аналога витамина В₂ - флаavinмононуклеотида (ФМН). Калориметрические исследования показали, что добавление ФМН приводит к увеличению температуры, энтальпии, энтропии и свободной энергии плавления ДНК в составе комплекса с БЭ. При разных температурах получены спектры поглощения двойных (БЭ-ДНК, ФМН-ДНК) и тройных (БЭ-ФМН-ДНК) систем. Сравнение экспериментальных спектров показало, что интенсивность суммарного (БЭ-ДНК+ФМН-ДНК) спектра выше, чем экспериментального, причем разница увеличивается с ростом температуры. Эффекты, обнаруженные методами ДСК и СФ, могут быть объяснены увеличением концентрации связанного с ДНК бромистого этидия в присутствии ФМН. **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** конкурентное связывание, флаavinмононуклеотид, бромистый этидий, ДНК, калориметрия, спектрофотометрия.

ВПЛИВ ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДА НА ВЗАЄМОДІЮ В СИСТЕМІ БРОМИСТИЙ ЕТИДИЙ - ДНК**А.А. Герус, О.В. Фомін, Н.О. Гладковська, К.Г. Березняк,****Є.В. Духопельников, А.С. Хребтова, О.В. Зінченко****Институт радіофізики та електроніки НАН України, вул.Ак.Проскури, 12, м.Харків, 61085***Институт проблем криобіології та криомедицини НАН України, вул.Переяславська, 23, м.Харків, 61015*

Методами диференційної скануючої калориметрії (ДСК) та спектрофотометрії (СФ) проведено дослідження взаємодії інтеркалятора бромистого етидія (БЕ) з ДНК у присутності аналога вітаміна В₂ - флаavinмононуклеотида (ФМН). Калориметричні дослідження показали, що додавання ФМН призводить до зростання температури, ентальпії, ентропії та вільної енергії плавлення ДНК у складі комплексу з БЕ. При різних температурах було отримано спектри поглинання подвійних (БЕ-ДНК, ФМН-ДНК) та потрійних (БЕ-ФМН-ДНК) системах. Порівняння експериментальних спектрів поглинання показало, що інтерсивність сумарного спектру (БЕ-ДНК+ФМН-ДНК) є вищою, ніж експериментального, при чому різниця збільшується зі зростанням температури. Ефекти, що було виявлено нами методами ДСК та СФ, можуть бути пояснені збільшенням концентрації зв'язаного з ДНК бромистого етидія у присутності ФМН.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: конкурентне зв'язування, флаavinмононуклеотид, бромистий етидій, ДНК, калориметрія, спектрофотометрія.

THE INFLUENCE OF FLAVIN MONONUCLEOTIDE ON INTERACTION IN ETHIDIUM BROMIDE-DNA SYSTEM**A.A. Gerus, A.V. Fomin, N.A. Gladkovskaya, E.G. Berezhnyak,****E.V. Dukhopelnikov, A.S. Khrebtova, A.V. Zinchenko****Institute for Radiophysics and Electronics, NAS of Ukraine, 12 Ak. Proskura Str., Kharkov, 61085, Ukraine***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine,
23 Pereyaslavskaya st., Kharkov, 61015, Ukraine*

The study of intercalator ethidium bromide (EB) interaction with DNA in the presence of vitamin B₂ analogue flavin mononucleotide (FMN) is carried out using the differential scanning calorimetry (DSC)

© А.А. Герус, А.В. Фомин, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк,

Е.В. Духопельников, А.С. Хребтова, А.В. Зинченко, 2014

and spectrophotometry (SF). Calorimetric investigations indicate that addition of FMN leads to the increase of DNA melting temperature, enthalpy, entropy and free energy in its complex with EB. The spectra of binary (EB-DNA, DNA-FMN) and ternary (FMN-EB-DNA) systems at different temperatures are obtained. Comparison of the experimental spectra shows that the intensity of the summary spectrum (EB-DNA+FMN-DNA) is higher than the intensity of the ternary system spectrum obtained experimentally. It should be noted that the intensity difference rises with the temperature increasing. The observed by DSC and SF effects can be explained by the increase of the concentration of ethidium bromide associated with DNA in the presence of FMN.

KEY WORDS: competitive binding, flavin mononucleotide, ethidium bromide, DNA, calorimetry, spectrophotometry.

В настоящее время широкое применение биологически активных ДНК-связывающихся лигандов в качестве противоопухолевых и антибактериальных агентов лимитируется их высокой токсичностью [1, 2]. Структурной особенностью таких лигандов является наличие плоского гетероциклического ароматического хромофора, способного интеркалировать в двойную спираль ДНК [3-6]. Многие вещества, получаемые с пищей или синтезирующиеся клетками организма, также могут взаимодействовать с ДНК и проявлять при этом ингибирующую активность по отношению к лекарственным препаратам, природным и синтетическим мутагенам [7, 8]. Присутствие таких активных соединений может снижать токсичность ароматических лигандов при клиническом применении. Основными молекулярными механизмами изменения токсичности являются гетероассоциация лигандов (интерцепторный механизм) и конкуренция за места связывания с ДНК (протекторный механизм) [9, 10].

Бромистый этидий (БЭ) относится к классическим интеркаляторам. В ряде исследований последних лет показано, что БЭ в зависимости от концентрации и условий среды взаимодействует с ДНК несколькими способами, а величина константы связывания изменяется в интервале $10^4 \text{ M}^{-1} \div 10^7 \text{ M}^{-1}$ [11-15]. Интерес к исследованию БЭ в рамках проблемы конкурентного связывания во многом можно объяснить тем, что этот лиганд является удобной меткой (зондом) при изучении тройных систем различными спектральными методами [16-21]. С точки зрения биологической активности БЭ проявляет некоторые антибактериальные свойства и считается сильным мутагеном [22-24].

Флавиномононуклеотид (ФМН) является аналогом витамина В₂ и обладает антиоксидантным действием [25, 26]. Была показана возможность реализации интерцепторного механизма влияния ФМН на эффективность действия биологически активных лигандов. Об этом свидетельствует образование энергетически прочных гетерокомплексов между ФМН и лигандами с величинами констант связывания $\sim 10^2 \div 10^4 \text{ M}^{-1}$ [27-29]. В то же время проявление флавиномононуклеотидом протекторных свойств остается предметом дискуссий. Так, в работе [30] с помощью метода ЯМР спектроскопии было определено, что величина константы связывания ФМН с коротким фрагментом ДНК составляет $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. В тоже время авторы работ [31, 32] не смогли

оценить константу связывания ФМН с ДНК вследствие его очень слабого связывания.

При изучении связывания лигандов с ДНК в растворе широко используется видимая спектрофотометрия (СФ). Этот метод позволяет наблюдать за изменениями спектров веществ при комплексообразовании. Также информация, необходимая для интерпретации эффектов, возникающих при одновременном использовании нескольких препаратов, может быть получена при исследовании термодинамических параметров связывания лигандов с ДНК. Распространенным методом исследования термодинамики в системах лиганд-ДНК является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Метод калориметрии позволяет получить термодинамические параметры плавления свободной ДНК, ДНК в составе комплексов с лигандом, и оценить влияние конкурента на плавление системы ДНК-лиганд.

Цель данной работы – исследовать влияние флавиномононуклеотида на связывание бромистого этидия с ДНК методами СФ и ДСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались коммерческая *salmon testes* ДНК фирмы "Serva", флави-мононуклеотид и бромистый этидий фирмы "Fluka" без дополнительной очистки. Структурные формулы ФМН и БЭ приведены на рис.1. Калориметрические и спектрофотометрические исследования смесей лиганды – ДНК проведены в стандартном фосфатном буферном растворе (2.5×10^{-3} М KH_2PO_4 , 2.5×10^{-3} М Na_2HPO_4 , рН=6.86) при значении ионной силы $I=0.025$ М.

Измерения теплопоглощения свободной ДНК, ДНК в смеси с БЭ и в тройной системе ДНК-ФМН-БЭ проведены на дифференциальном сканирующем микрокалориметре DASM-4 при скорости прогрева растворов 1 град/мин. Зависимости избыточной молярной теплоемкости от температуры получены с учетом базовой линии, проведенной между точками, соответствующими температурам начала и конца перехода. Расчет термодинамических параметров связывания ΔH , ΔG , ΔS из данных ДСК для смесей БЭ-ДНК и БЭ-ФМН-ДНК проведен по стандартным уравнениям [33].

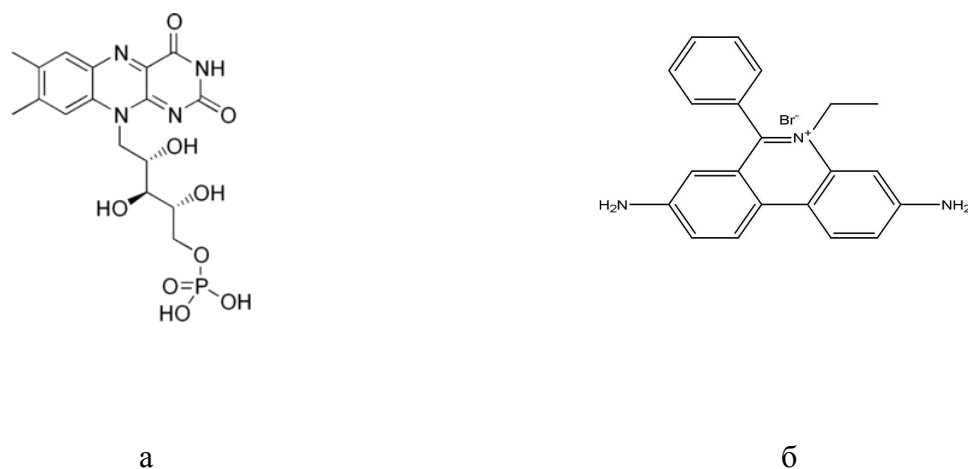


Рис.1. Структурные формулы флавиномононуклеотида (а) и бромистого этидия (б).

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре "Specord M40" (Германия) в видимой области спектра в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. При определении концентрации компонентов использовали значения молярного коэффициента экстинкции: для ДНК $\varepsilon_{260}=6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [34], ФМН $\varepsilon_{445}=1.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [35], БЭ $\varepsilon_{480}=5.68 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [36].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.2 представлены кривые теплопоглощения ДНК в составе смесей с БЭ (сплошная линия) и с БЭ-ФМН (пунктир). Калориметрические измерения проводились при постоянной концентрации ДНК и ФМН ($P=D_{\text{ФМН}}=3 \times 10^{-3} \text{ M}$, $P/D_{\text{ФМН}}=1$) и при различных концентрациях БЭ ($P/D_{\text{БЭ}}=4.4 \div 30$).

Видно, что при добавлении БЭ кривые теплопоглощения ДНК становятся двухфазными. Первый пик на кривых соответствует плавлению участков ДНК с низкой степенью насыщения лигандом, а второй – с высокой. В целом БЭ, как любой стандартный интеркалятор, стабилизирует ДНК, смещая температуру плавления в высокотемпературную область.

Ранее нами было показано, что кривые теплопоглощения ДНК не изменяются в присутствии ФМН [37]. Для анализа влияния ФМН на взаимодействие БЭ с ДНК получены кривые теплопоглощения для тройной системы ДНК-БЭ-ФМН (рис.2, пунктир). Добавление ФМН к смеси БЭ-ДНК вызывает увеличение температуры первого пика на кривой теплопоглощения и относительного вклада второго пика. Также наблюдается существенный рост параметров плавления ΔH , $T\Delta S$, ΔG системы ДНК-БЭ-ФМН (рис.3, пунктир) по сравнению с системой БЭ-ДНК (рис.3, сплошные линии).

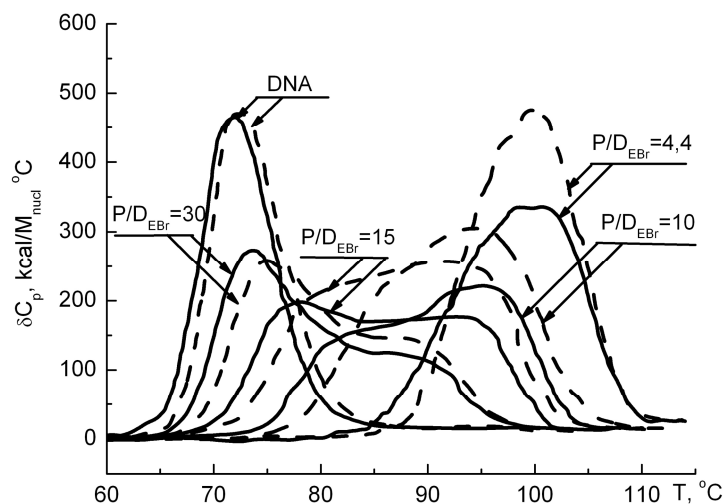


Рис.2. - Кривые теплопоглощения ДНК в составе смесей с БЭ (сплошные линии) и БЭ и ФМН (пунктир) в растворе с $I=0.025$ М. Концентрация ФМН и ДНК во всех смесях поддерживалась постоянной ($P/D_{\text{ФМН}}=1$).

Такие эффекты не могут быть объяснены протекторным или интерцепторным действием ФМН, поскольку эти механизмы обычно приводят к противоположным изменениям на кривых теплопоглощения. Увеличение температуры и параметров плавления ДНК в составе комплекса может быть объяснено увеличением концентрации связанного лиганда.

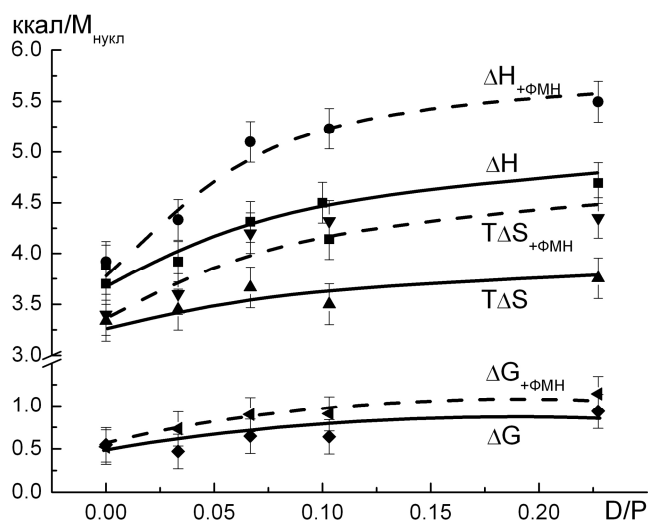


Рис.3. Зависимости ΔH , ΔG , $T\Delta S$ плавления от D/P для систем ДНК-БЭ (сплошные линии) и ДНК-БЭ-ФМН (пунктир) в растворе с $I=0.025$ М.

Таким образом, мы наблюдаем некий синергетический эффект – увеличение концентрации связанного с ДНК БЭ в присутствии ФМН. В тоже время, исследования связывания интеркалятора дауномицина в присутствии ФМН показали, что и гетероассоциация этих лигандов в растворе, и связывание ФМН с тетра nukлеотидом препятствуют взаимодействию дауномицина с фрагментом ДНК [30].

Для подтверждения данных, полученных методом ДСК, были проведены температурные измерения систем БЭ-ДНК, ФМН-ДНК и БЭ-ФМН-ДНК методом видимой спектрофотометрии. Так как наибольшие изменения кривых теплопоглощения смеси БЭ-ДНК при добавлении флавиномононуклеотида происходили при $P/D_{БЭ}=10\div 15$, для анализа методом СФ были исследованы растворы именно с такими соотношениями концентраций ДНК и БЭ. Проведение спектрофотометрических измерений системы БЭ-ФМН-ДНК при $P/D_{ФМН}=1$, при котором были получены ДСК кривые, не информативно с точки зрения оценки вклада БЭ в спектр тройной системы. Это связано с тем, что максимум поглощения ФМН ($\lambda=445$ нм) лежит достаточно близко к максимуму поглощения БЭ ($\lambda=480$ нм), а молярный коэффициент экстинкции у ФМН намного выше, чем у БЭ (см. Материалы и методы). Поэтому нами были рассмотрены смеси ФМН-ДНК и БЭ-ФМН-ДНК с более низкой концентрацией ФМН ($D_{ФМН}\approx D_{БЭ}$).

На рис. 4 представлены спектры поглощения систем ФМН-ДНК при $P/D_{ФМН}=10$ (1 и 1'), БЭ-ДНК при $P/D_{БЭ}=11$ (2 и 2') и тройной системы БЭ-ФМН-ДНК (3 и 3') при температурах 30°C (сплошная линия) и 87°C (пунктир). Для проведения анализа изменений спектра смеси БЭ-ДНК при добавлении ФМН было проведено сравнение экспериментальных спектров тройной системы с суммарными спектрами двойных систем БЭ-ДНК+ФМН-ДНК (рис.4, кривые 4 (30°C) и 4' (87°C)).

Из рис.4 видно, что спектр поглощения системы ФМН-ДНК при нагревании практически не изменяется (кривые 1 и 1'). Повышение температуры приводит к коротковолновому смещению спектра смеси БЭ-ДНК, что свидетельствует об увеличении концентрации свободного лиганда (кривые 2 и 2'). Спектр тройной системы БЭ-ФМН-ДНК с нагреванием незначительно возрастает и смещается в длинноволновую область (кривые 3 и 3'). Из сравнения поглощения тройной системы БЭ-ФМН-ДНК и суммы поглощений систем БЭ-ДНК+ФМН-ДНК (кривые 4 и 4') видно, что интенсивность экспериментального спектра ниже суммарного (кривые 3 и 4).

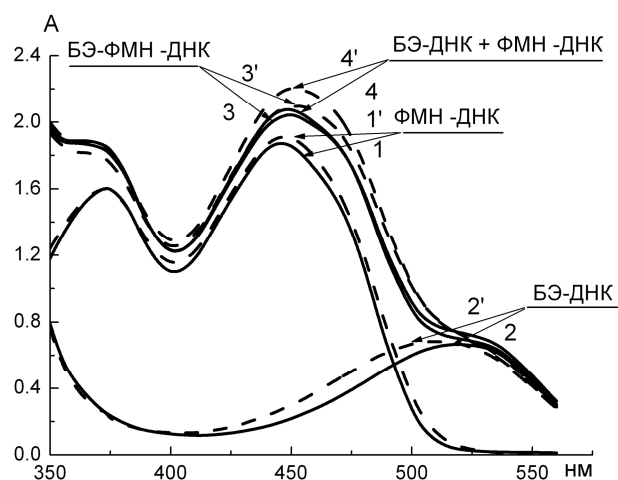


Рис.4. Спектры поглощения систем ФМН-ДНК (1 и 1'), БЭ-ДНК (2 и 2'), тройной системы БЭ-ФМН-ДНК (3 и 3') и суммы спектров двойных систем БЭ-ДНК+ФМН-ДНК (4 и 4') при температурах 30°C (сплошная линия) и 87°C (пунктир) в растворе с $I=0.025$ M ($P=1.5 \times 10^{-4}$ M, $D_{BЭ}=1.35 \times 10^{-4}$ M, $D_{ФМН}=1.5 \times 10^{-4}$ M).

Следует отметить, что видимое отличие наблюдается в промежутке $\lambda=440\div 480$ нм и увеличивается с ростом температуры (кривые 3' и 4'). В этом интервале длин волн спектр ФМН мало изменяется и практически не смещается при нагревании (кривые 1 и 1'), а основной вклад в разницу между интенсивностью экспериментального и суммарного спектров дает коротковолновое смещение полосы поглощения БЭ, которое максимально проявляется именно в диапазоне 440÷480 нм (кривые 2 и 2'). Интенсивность суммарного спектра будет больше, чем экспериментального в том случае, если коротковолновое смещение спектра БЭ в тройной системе меньше, чем в двойной, т.е. в том случае, если концентрация связанного с ДНК бромистого этидия в присутствии ФМН увеличивается.

ВЫВОДЫ

Экспериментальные исследования двойных (БЭ-ДНК, ФМН-ДНК) и тройной (БЭ-ФМН-ДНК) систем методами СФ и ДСК показали, что ФМН влияет на взаимодействие БЭ с ДНК, увеличивая количество связанного БЭ. Таким образом, флавиномононуклеотид не проявляет ни протекторных, ни интерцепторных свойств при связывании бромистого этидия с ДНК. Для объяснения механизма наблюдаемого синергетического эффекта при взаимодействии ФМН и БЭ с ДНК требуются дальнейшие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chu E. Physicians' cancer chemotherapy drug manual / E. Chu, V. T. DeVita. - London: Jones and Bartlett Pub, 2003. — 506 p.
2. Stockley I. H. Stockley's Drug Interactions / I. H. Stockley. — [6th ed.] — London: Pharm. Press, 2002. — 1080 p.

3. Neidle S. Molecular aspects of Anti-cancer drug action / S. Neidle, M. J. Waring. - London: Macmillan, 1983. — 233 p.
4. Pullman B. Molecular mechanism of specificity in DNA-antitumor drug interactions / B. Pullman // *Adv. Drug Res.* — 1989. — V.18. - P. 2—112.
5. Graves D. E. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids/ D. E. Graves, L. M. Velea// *Curr. Org. Chem.* — 2000. — V. 4. — P. 915—928.
6. Intercalators as anticancer drugs/ M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* - 2001. — V. 7. — P. 1745—1780.
7. Gianni L. Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes/ L. Gianni, E. Salvatorelli, G. Minotti // *Cardiovascular Toxicology.* — 2007. — V. 7., №2. — P. 67—71.
8. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer/ J. F. S. Ferreira, D. L. Luthria, T. Sasaki, A. Heyerick // *Molecules.* — 2010. — V.15. — P.3135—3170.
9. Мосунов А. А. Молекулярные механизмы действия ароматических биологически активных соединений на связывание антибиотика топотекана с ДНК / А. А. Мосунов, М. П. Евстигнеев // *Вісник СевНТУ.* — 2011. — Вип.113. — Серія: Фізика біологічних систем і молекул. — С. 99—105. /Mosunov A. A. Molekuljarnye mehanizmy dejstvija aromaticeskix biologiceski aktivnyh soedinenij na svjazyvanie antibiotika topotekana s DNK / A. A. Mosunov, M. P. Evstigneev // *Visnik SevNTU.* — 2011. — Vip.113. — Serija: Fizika biologichnih sistem i molekul. — С. 99—105./
10. Евстигнеев В. П. Теоретическое исследование интерцепторно-протекторного механизма действия ДНК-связывающихся ароматических препаратов в комбинации при низких концентрациях лиганда-перехватчика/ В. П. Евстигнеев, А. С. Бучельников, Д. С. Лохова // *Севастопольский национальный технический университет. – Биофиз. складних систем.* — 2010. — С. 3—14. /Evstigneev V. P. Teoreticheskoe issledovanie interseptorno-protetornogo mehanizma dejstvija DNK-svjazyvajushhhsja aromaticeskix preparatov v kombinacii pri nizkix koncentracijah liganda-perehvatchika/ V. P. Evstigneev, A. S. Buchel'nikov, D. S. Lohova // *Sevastopol'skij nacional'nyj tehniceskij universitet. – Biofiz. skladnih sistem.* — 2010. — С. 3—14./
11. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures/ P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan [et al.] // *Experimental and Molecular Medicine.* — 2003. — V. 35. №. 6. — P. 527—533.
12. A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: scanning force microscopy / J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Williams, L. A. Bottomley // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* — 1996. — V. 93. — № 22. — P. 12283—12286.
13. Hayashi M. Direct observation of the reversible unwinding of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide/ M. Hayashi, Y. Harada // *Nucleic Acids Research.* — 2007. — V. 35., № 19. — P. 1—7.
14. Исследование взаимодействия бромистого этидия с ДНК спектральным и электрохимическим методами/ П. О. Вардеванян, А. П. Антонян, К. В. Пирумян, Л. А. Тавадян // *Доклады НАН РА.* — 2008. — V. 108., №1. — P. 75—83. /Issledovanie vzaimodejstvija bromistogo jetidija s DNK spektral'nym i jelektrohimeskim metodami/ P. O. Vardevanjan, A. P. Antonjan, K. V. Pirumjan, L. A. Tavadjan // *Doklady NAN RA.* — 2008. — V. 108., №1. — P. 75—83./
15. A Study of Drug Binding to DNA by Partial Intercalation Using a Model Phenazine Derivative/ V. Kleinwachter, Z. Balcarova, K.E. Reinert [et al.] // *Gen. Physiol. Biophys.* — 1986. — V. 5. — P.423—432.
16. Zhang G. Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe/ G. Zhang, X. Hu, P. Fu // *Journal of Photochemistry and Photobiology.* — B: Biology. — 2012. — V. 108. — P. 53—61.
17. Spectroscopic study on the interaction of ct-DNA with manganese Salen complex containing triphenyl phosphonium groups / M. N. Dehkordi, A.-Kh. Bordbara, P.Lincoln, V. Mirkhani // *Spectrochimica Acta (Part A).* — 2012. — V.90 — P. 50—54.
18. Competitive interactions of adriamycin and ethidium bromide with DNA as studied by full rank parallel factor analysis of fluorescence three-way array data / H.-P. Xie, X. Chu, J.-H. Jiang [et al.] // *Spectrochimica Acta (Part A).* — 2003. — V. 59. — P. 743—749.
19. Determination of the DNA-binding characteristics of ethidium bromide, proflavine, and cisplatin by flow injection analysis: Usefulness in studies on antitumor drugs/ A. Alonso, M. J. Almendral, Y. Curto, [et al.] // *Analytical Biochemistry.* — 2006. — V. 355. — P. 157—164.

20. De-intercalation of ethidium bromide and propidium iodine from DNA in the presence of caffeine / J. Piosik, K. Wasielewski, A. Woziwodzka [et al.] // *Cent. Eur. J. Biol.* — 2010 — V. 5 (1). — P. 59—66.
21. Light-absorption spectroscopy of mutagen-DNA complex in presence of competing biologically active compounds/ Ie. Iermak, A. Woziwodzka, A. Gwizdek-Wisniewska, J. Piosik // *General Assembly and Scientific Symposium—2011.* — XXXth URSI. — P. 1—4.
22. Prophylactic effects of isometamidium- and ethidium-sustained release devices against *Trypanosoma congolense* in cattle/ S. Geerts., P. Kageruka, R. De Deken [et al.] // *Acta Trop.* — 1997 — V. 65. — P. 23—31.
23. The effects of drug-sensitive and drug-resistant *Trypanosoma congolense* infections on the pharmacokinetics of homidium in Boran cattle/ G. A. Murilla., A. S. Peregrine, J. M. Ndung'u, [et al.] // *Acta Trop.* — 2002. — V. 81 — P. 185—195.
24. The hepatic metabolism of ethidium bromide to reactive mutagenic species: biochemical and structural requirements/ P. Lecoint, N. Bichet, C. Fraire, C. Paoletti // *Biochem. Pharmacol.* — 1981. — V. 30 — P. 601—609.
25. Мухина Ю. В. Связывание ароматических лигандов с ДНК в присутствии витамина / Ю. В. Мухина, М. П. Евстигнеев // *Вестник СевГТУ.* — 2005. — Т.70. — С. 62—73. /Muhina Ju. V. Svjazyvanie aromaticeskikh ligandov s DNK v prisutstvii vitamina / Ju. V. Muhina, M. P. Evstigneev // *Vestnik SevGTU.* — 2005. — Т.70. — С. 62—73./
26. Riboflavin therapy. Biochemical heterogeneity in two adult lipid storage myopathies/ L. Vergani, M. Barile, C. Angelini [et al.] // *Brain.* — 1999. — V. 122., №. 12. — P. 2401—2411.
27. Evstigneev M. P. 1H NMR study of thehetero-association of flavin-mono-nucleotide with mutagenic dyes: ethidium bromide and proflavine/ M. P. Evstigneev, Yu. V. Mukhina, D. B. Davies // *Mol. Phys.* — 2006. — V. 104. — P. 647—654.
28. A structural and thermodynamic analysis of novatrone and flavin mono-nucleotide heteroassociation in aqueous solution by 1H NMR spectroscopy/ A. N. Veselkov, M. P. Evstigneev, A. O. Rozvadovska [et al.] // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* — 2005. — V. 31. — P. 453—459.
29. 1H NMR analysis of the complex formation of aromatic molecules of antibiotic and vitamin in aqueous solution: Heteroassociation of actinomycin D and flavin mono-nucleotide/ A. N. Veselkov, M. P. Evstigneev, A. O. Rozvadovskaya, [et al.] // *Biophysics.* — 2005. — V. 50. — P. 20—27.
30. Evstigneev M. P. Complexation of daunomycin with a DNA oligomer in the presence of an aromatic vitamin (B2) determined by NMR spectroscopy/ M. P. Evstigneev, Yu. V. Mykhina, D. B. Davies // *Biophys. Chemist.* — 2005. — V. 118. — P. 118—127.
31. N. Dardare. Binding Affinities of Commonly Employed Sensitizers of Viral Inactivation/ N. Dardare, M.S. Platz // *Photochemistry and Photobiology.* — 2002. - V. 75(6). - P. 561—564.
32. Kuratomi K. Studies on the interactions between DNA and flavins/ K. Kuratomi, Y. Kobayashi // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1977. — V. 476. — P. 207—217.
33. Особенности взаимодействия профлавина с ДНК при различных соотношениях их концентраций/ Е.Г. Березняк, Н.А. Гладковская, Е.В. Духопельников [и др.] // *Биофизика.* — 2009. — Т. 54., В 5. — С. 805—812. /Osobennosti vzaimodejstvija proflavina s DNK pri razlichnyh sootnoshenijah ih koncentracij/ E.G. Bereznyak, N.A. Gladkovskaja, E.V. Duhopel'nikov [i dr.] // *Biofizika.* — 2009. — Т. 54., V 5. — С. 805—812./
34. Barcelo F. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA/ F. Barcelo, D. Capo, J. Portugal // *Nucleic Acids Research.* — 2002. — V. 30., №. 20. — P. 4567—4573.
35. Flavin mono-nucleotide fluorescence intensity decay in concentrated aqueous solutions/ H. Grajek, I. Gryczynski, P. Wojarski, [et al.] // *Chemical Physics Letters.* — 2007. — V. 439. — P. 151—156.
36. Бабаян Ю. С. Связывание бромистого этидия с полирибогуаниловой кислотой/ Ю. С. Бабаян // *Биополимеры и клетка.* — 1989. — Т.5., №36. — С.79—82.
37. Спектроскопическое и калориметрическое исследование системы флавиномононуклеотид-ДНК / Е.Г. Березняк, Н.А. Гладковская, Е.В. Духопельников [и др.] // *Біофізичний вісник.* — 2010. — Т. 24 (1). — С. 14—19. /Spektroskopichesкое i kalorimetriceskoe issledovanie sistemy flavin-mono-nukleotid-DNK / E.G. Bereznyak, N.A. Gladkovskaja, E.V. Duhopel'nikov [i dr.] // *Biofizichnij visnik.* — 2010. — Т. 24 (1). — С. 14—19./