

УДК 577.323

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО АКТИНОЦИНА АСТ III НА ПЛАВЛЕНИЕ ДНК В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ ДНК – АСТ III ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ЛИГАНДА

Е.Г. Березняк, Е.Б. Круглова, А.С. Хребтова, Е.В. Духопельников, А.В. Зинченко*

Институт радиофизики и электроники НАН Украины, ул.Ака.Проскуры, 12, г.Харьков, 61085, Украина

**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул.Перейславская, 23, г.Харьков, 61015, Украина*

e-mail: berez@ire.kharkov.ua

Поступила в редакцию 30 июля 2007 г.

На основании анализа спектрофотометрических концентрационных зависимостей в системе тимусная ДНК – производное актиноцина Аст III получена информация о типах комплексов и их стехиометрии при ионной силе раствора 0.015 М Na⁺. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии получены термодинамические параметры плавления ДНК в составе этих комплексов. Показано, что в системе ДНК – Аст III в зависимости от соотношения концентраций ДНК и лиганда (P/D) образуются два типа комплексов, существенно различающихся по термодинамическим параметрам и структуре. При низких значениях P/D Аст III связывается преимущественно с сахарофосфатным остовом, образуя комплексы, неспецифичные к нуклеотидной последовательности. При высоких значениях P/D происходит образование комплексов по типу интеркаляции, которое приводит к изменению структуры GC-обогащенных участков ДНК. В области средних значений P/D, где сосуществуют оба типа комплексов, в процессе плавления происходит перераспределение лиганда, которое приводит к увеличению концентрации Аст III в составе комплекса по типу агрегации. Показано, что величины мест связывания, определенные методами спектрофотометрии и калориметрии, существенно отличаются.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, производное актиноцина, дифференциальная сканирующая калориметрия, спектрофотометрия, мультимодальное связывание, термодинамика.

Известно, что многие лекарственные препараты могут образовывать на матрице ДНК одновременно несколько типов комплексов [1-5]. Так, Франк-Каменецким с соавт. было показано, что экспериментальные кривые плавления комплексов ДНК с такими "классическими" интеркаляторами, как бромистый этидий и актиномицин D невозможно теоретически объяснить в предположении, что эти лиганды связываются с ДНК только одним способом [5]. Позднее при сравнении результатов титрования в системе бромистый этидий – ДНК методами спектроскопии в видимой области и флуоресценции было обнаружено, что в зависимости от соотношения концентраций ДНК и лиганда (P/D) и ионной силы существует как минимум два типа комплексов [6]. Методами спектрофотометрии [7-9] и ЯМР [10] было показано, что актиномицин D может связываться не только с двуспиральными, но и с односпиральными участками ДНК, а также с последовательностями, которые не характерны для образования комплексов по типу интеркаляции. При этом практически для всех лигандов тип образующегося комплекса зависит от ионной силы раствора, нуклеотидного состава и последовательности, а также от соотношения P/D [11]. Мультимодальность связывания в таких системах приводит к трудностям при расчете соотношения различных типов комплексов и при определении термодинамических параметров для каждого из комплексов.

Производные актиноцина (аналоги актиномицина D) также могут образовывать с ДНК как минимум два типа комплексов, относительное содержание которых существенно зависит от P/D [12]. В данной работе для получения информации о типах комплексов, их стехиометрии и соотношении в растворе с низкой ионной силой была использована методика анализа спектрофотометрических концентрационных зависимостей в системе ДНК – лиганд [13]. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии проведено исследование влияния производного актиноцина Аст III на термодинамические параметры перехода спираль – клубок для ДНК из тимуса телят в растворах с такими значениями P/D, при которых соотношение различных типов комплексов существенно отличается.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе была использована коммерческая ДНК из тимуса телят фирмы "Serva". Структурная формула антибиотика актиноцинового ряда актиноцил-бис(3-диметиламинопропил)амин (Аст III) приведена на рис. 1. Спектральные и аналитические характеристики производного актиноцина Аст III (M=568 Да) приведены в работе [12].

Исследования комплексообразования Act III с ДНК проводились в фосфатном буферном растворе при $\text{pH}=6.86$ и ионной силе 0.015 M Na^+ в широком интервале P/D , где P/D – отношение концентрации фосфатов ДНК (C_p) к концентрации лиганда (C_D). Для определения концентрации ДНК использовали значение молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{260}=6.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Концентрация Act III определялась с использованием значения молярного коэффициента экстинкции в изобестической точке мономер-димерного равновесия $\epsilon_{400}=1.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [14].

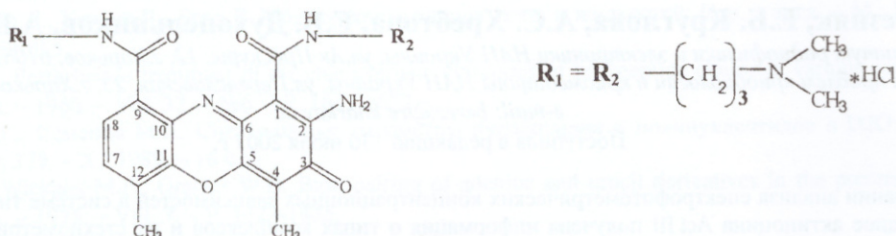


Рис. 1. Структурная формула актиноцил-бис(3-диметиламинопропил)амин (Act III).

Спектры поглощения смесей ДНК – Act III были получены в термостатированных кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре Specord M40 (Германия). Расчет констант связывания Act III с ДНК был проведен с помощью программы оптимизации DALSMOD, которая описывает процессы связывания лигандов с полиэлектролитными матрицами [13]. Оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции комплексов и соответствующие константы связывания были получены путем минимизации суммы квадратов отклонений наблюдаемых оптических плотностей A_{ij} (в i -ом растворе при j -ой длине волны) от расчетных, вычисляемых по закону Ламберта-Бера как $A_{ij}=\sum [c_{ik}] \cdot \epsilon_{kj}$. Соответствие выбранной модели экспериментальным данным определялось путем сравнения факторов Гамильтона Q с предельными значениями факторов Гамильтона Q_{lim} , которые рассчитывались при каждом выходе из программы оптимизации с учетом ошибок в измерении оптической плотности ($\Delta A=0.005$) и общих концентраций (1%). Модель удовлетворяет экспериментальным данным, если $Q < Q_{lim}$. Процесс оптимизации повторялся на той же базе данных при разных значениях n и ω , где n – число нуклеотидов, занимаемых связанным лигандом на матрице ДНК, ω – фактор кооперативности, характеризующий образование агрегатов на том же месте связывания.

Измерения теплотеплопоглощения свободной ДНК и ДНК в комплексах с Act III проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре DASM-4 с объемом измерительной ячейки 0.4553 мл и скоростью прогрева растворов 1 град/мин. Мощность калибровочного импульса составляла $25 \cdot 10^{-6} \text{ W}$. Исследования проводились в растворах с концентрацией полинуклеотида $1.6 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Зависимости избыточной молярной теплоемкости от температуры были получены с учетом базовой линии, проведенной между точками, соответствующими температурам начала и конца перехода [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены спектры поглощения смесей ДНК - Act III при постоянной концентрации Act III и разных значениях P/D в видимой области. Наличие двух изобестических точек ($\lambda=475 \text{ nm}$ и $\lambda=430 \text{ nm}$) свидетельствует о том, что в данной системе образуется, как минимум, два типа комплексов. При образовании первого типа комплексов в области низких значений P/D наблюдается падение поглощения Act III без существенного изменения формы спектров. Дальнейшее увеличение концентрации ДНК сопровождается длинноволновым смещением спектров и ростом поглощения в максимуме $\lambda=475 \text{ nm}$, что свидетельствует об образовании второго типа комплексов.

Анализ разных моделей связывания показал, что концентрационные зависимости спектров поглощения, наблюдаемые в системе ДНК – производные актиноцина, наилучшим образом описывает модель, согласно которой два типа комплексов образуются на двух разных местах связывания с учетом образования агрегатов в области низких значений P/D [13]. С помощью программы оптимизации DALSMOD по этой модели были рассчитаны параметры связывания и оптимальные молярные коэффициенты экстинкции для различных типов комплексов (рис. 3а). Величины констант и мест связывания для исследуемой системы $n_1=2.0 \pm 0.1$, $K_1=(3.4 \pm 0.5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n_2=12 \pm 0.2$, $K_2=(1.4 \pm 0.5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ находятся в хорошем согласии с соответствующими значениями, определенными ранее для смесей ДНК – Act III в водном растворе с ионной силой 0.08 M Na^+ [16].

Влияние производного актиноцина Act III на плавление ДНК ...

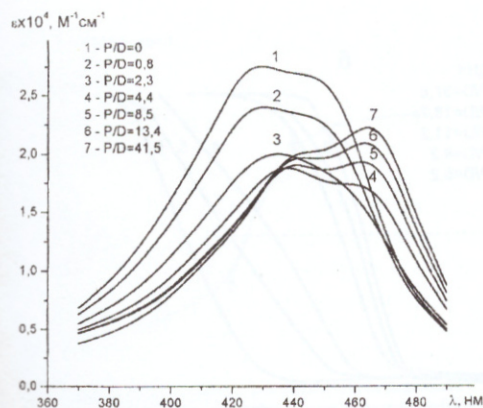


Рис. 2. Спектры поглощения смесей ДНК – Act III в зависимости от концентрации ДНК в растворе с ионной силой 0.015 М Na⁺ в видимой области спектра при постоянной концентрации лиганда $C_D = 4.58 \cdot 10^{-5}$ М.

Полученные величины констант и мест связывания позволяют рассчитать равновесный состав любой смеси ДНК - Act III при заданных начальных концентрациях реагирующих компонентов. На рис. 3 представлены зависимости от P/D относительных равновесных концентраций лиганда (рис. 3б) и ДНК (рис. 3в) в составе комплексов по первому типу связывания (1 и 1') и по типу интеркаляции (2). Видно, что во всем рассмотренном интервале P/D в растворе присутствуют оба типа комплексов.

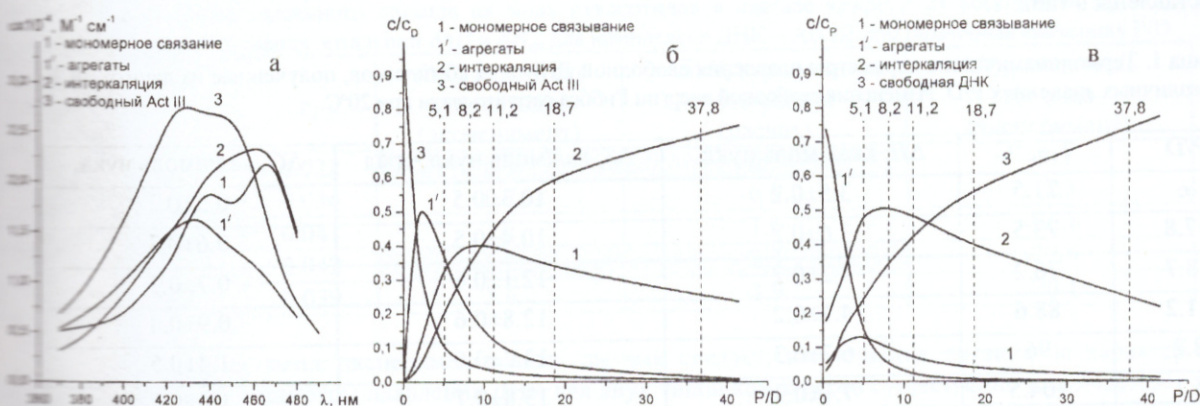


Рис. 3. Оптимальные молярные коэффициенты экстинкции лиганда в составе разных типов комплексов с ДНК (а); зависимости от P/D относительных равновесных концентраций лиганда (б) и ДНК (в) в составе этих комплексов в растворе с ионной силой 0.015 М Na⁺ ($C_D = 4.58 \cdot 10^{-5}$ М). 1 – комплекс по первому типу связывания с константой K_1 и местом связывания n_1 ; 1' – агрегаты, образующиеся на месте связывания n_1 ; 2 – комплекс по второму типу связывания с константой K_2 и местом связывания n_2 .

За изменениями, происходящими с полинуклеотидной матрицей, можно проследить с помощью метода ДСК. Для исследования влияния Act III на плавление ДНК были выбраны такие значения P/D, при которых соотношение концентраций двух типов комплексов существенно различается (рис. 3б). На рис. 4а представлены кривые теплопоглощения свободной ДНК и ее комплексов с производным актиноцина. Изменения энтальпии (ΔH), энтропии (ΔS) и свободной энергии Гиббса (ΔG) для процесса тепловой денатурации свободной ДНК и ДНК в составе комплексов с Act III рассчитывались на моль нуклеотидов по стандартным уравнениям:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \quad (1)$$

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta C_p}{T} dT \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3)$$

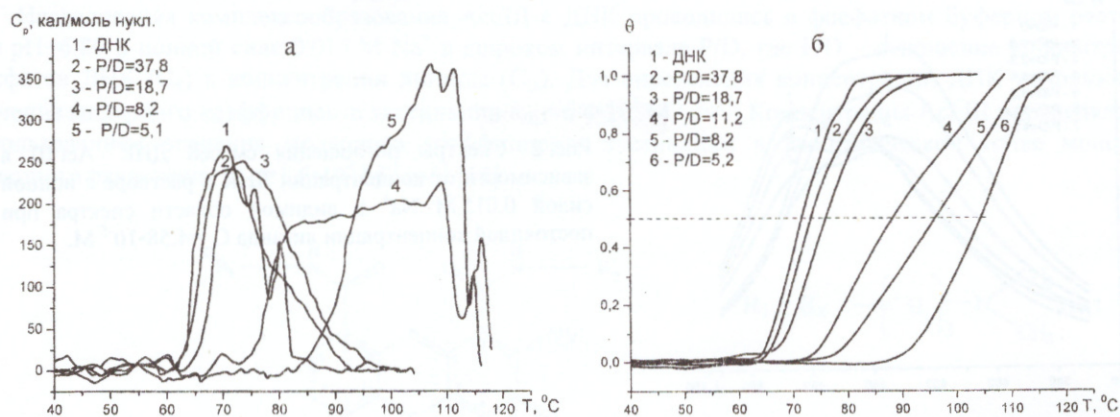


Рис. 4. Дифференциальные кривые теплопоглощения (а) и интегральные кривые плавления (б) свободной ДНК и комплексов ДНК – Act III при различных значениях P/D ($C_p = 1.6 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-3}$ M).

Так как ДНК из тимуса телянка обладает блочной гетерогенностью, на кривой теплопоглощения имеется несколько пиков, соответствующих плавлению блоков с разным AT/GC – составом [17]. Поэтому для определения температуры, при которой половина всей ДНК находится в расплетенном состоянии ($T_{1/2}$), по данным ДСК были построены интегральные кривые плавления (рис. 4б).

Термодинамические параметры плавления свободной ДНК и ее комплексов при различных значениях P/D, рассчитанные из кривых теплопоглощения по уравнениям (1-3), а также значения $T_{1/2}$ представлены в табл. 1.

Таблица 1. Термодинамические параметры плавления свободной ДНК и ее комплексов, полученные из данных ДСК при различных значениях P/D. Изменения свободной энергии Гиббса рассчитывали при 20°C.

P/D	$T_{1/2}$, °C	ΔH , ккал/моль нукл.	ΔS , кал/моль нукл.·град	ΔG , ккал/моль нукл.
∞	71.5	3.5 ± 0.2	10.3 ± 0.5	0.5 ± 0.3
37.8	73.5	3.6 ± 0.2	10.4 ± 0.5	0.6 ± 0.3
18.7	76.2	4.2 ± 0.2	12.1 ± 0.6	0.7 ± 0.3
11.2	88.6	4.7 ± 0.2	12.8 ± 0.6	0.9 ± 0.4
8.2	96	6.7 ± 0.3	13.2 ± 0.6	1.4 ± 0.5
5.1	104.5	7.1 ± 0.3	13.8 ± 0.7	1.6 ± 0.5

Для оценки параметров связывания производного актиноцина с ДНК из данных калориметрии мы воспользовались подходом, согласно которому изменение энтальпии плавления ДНК в комплексе по сравнению с энтальпией плавления свободной ДНК вызвано только взаимодействием лиганда с двуспиральной ДНК [18, 19]. При этом предполагалось, что взаимодействие лиганда с денатурированной ДНК отсутствует. Зная количество лиганда, связанного с одним нуклеотидом ДНК, можно рассчитать энтальпию связывания $\Delta H_{св}$, приходящуюся на один моль лиганда:

$$\delta\Delta H = (-\Delta H_{св})r, \quad (4)$$

где $\delta\Delta H$ – разница в энтальпии плавления одного моля нуклеотидов свободной ДНК и ДНК в составе комплекса с лигандом;

r – количество молей лиганда, связанного с одним молем нуклеотидов.

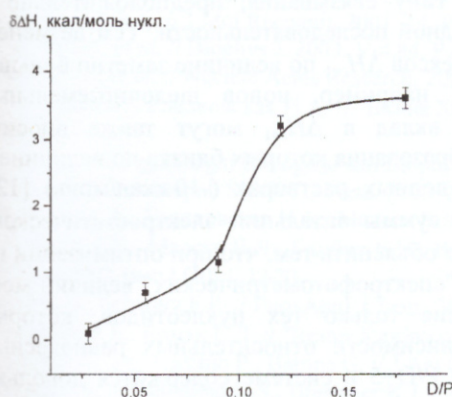
На рис. 4 приведена полученная экспериментальная зависимость энтальпии $\delta\Delta H$ для комплексов ДНК – Act III от D/P. Видно, что при увеличении концентрации лиганда $\delta\Delta H$ изменяется нелинейно. Это свидетельствует о том, что два типа комплексов, присутствующие в смеси, термодинамически различимы. Поэтому мы представили общее изменение $\delta\Delta H$ следующим образом:

$$\delta\Delta H = (-\Delta H_{св1})r_1 + (-\Delta H_{св2})r_2, \quad (5)$$

где $\Delta H_{св1}$ и $\Delta H_{св2}$ – энтальпии связывания лиганда с ДНК, рассчитанные на моль лиганда, при образовании каждого из двух типов комплексов;

r_1 и r_2 – количество связанного лиганда на моль нуклеотидов, определяемое как отношение равновесных концентраций лиганда в составе каждого из комплексов при соответствующем значении P/D (рис. 3б) к общей концентрации ДНК (C_p).

Влияние производного актиноцина Act III на плавление ДНК ...

Рис. 4. Зависимость энтальпии связывания Act III с ДНК, приходящейся на моль нуклеотидов ($\delta\Delta H$) от D/P.

По уравнению 5 были получены значения энтальпии связывания $\Delta H_{св1}$ и $\Delta H_{св2}$, при которых среднеквадратичное отклонение рассчитанных значений $\delta\Delta H$ от экспериментальных минимально во всей исследованной области концентраций лиганда: $\Delta H_{св1} = -27.3$ ккал/моль, $\Delta H_{св2} = -6.3$ ккал/моль. В табл. 2 для разных P/D приведены значения r_1 и r_2 и соответствующие экспериментальные и расчетные значения $\delta\Delta H$, а также величина энтальпии связывания $\Delta H_{св}$, полученная по уравнению 4 при $r = r_1 + r_2$. Видно, что наибольшие отклонения экспериментальных значений $\delta\Delta H$ от расчетных наблюдаются при P/D=37.8 и 8.2, что обсуждается ниже.

Таблица 2. Количество связанного лиганда на моль нуклеотидов в составе каждого из комплексов (r_1 и r_2) и соответствующие им значения энтальпий $\delta\Delta H$ и $\Delta H_{св}$ для комплексов ДНК – Act III при различных значениях P/D.

P/D	r_1	r_2	$\delta\Delta H$, ккал/моль нуклеотидов (эксперимент)	$\delta\Delta H$, ккал/моль нуклеотидов (расчет)	$\Delta H_{св}$, ккал/моль лиганда (эксперимент)
37.8	0.008	0.022	0.1	0.5	-3.3
18.7	0.024	0.034	0.7	0.9	-12.1
11.2	0.049	0.041	1.2	1.6	-12.8
8.2	0.075	0.042	3.2	2.3	-27.4
5.1	0.140	0.039	3.6	3.9	-20.1

Из приведенных выше экспериментальных данных следует, что влияние лиганда на характер и термодинамические параметры плавления ДНК для двух типов комплексов существенно различается.

При высоких значениях P/D (37 и 18) в смесях ДНК – Act III преобладают комплексы по второму типу связывания. Кривая теплопоглощения ДНК в составе этих комплексов (рис. 4а, кривые 2 и 3) в высокотемпературной области, соответствующей плавлению GC-обогащенных участков ДНК, искажена: не проявляются пики, характерные для плавления отдельных блоков, увеличивается ширина интервала плавления. Можно предположить, что в данном интервале P/D, как было показано ранее для комплексов ДНК с актиномицином D [23, 24], происходит специфическое связывание лиганда с GC-обогащенными участками ДНК, которое приводит к существенным изменениям параметров двойной спирали [20]. Полученное нами по уравнению 5 оптимальное значение энтальпии связывания для второго типа комплексов $\Delta H_{св2}$ (-6.3 ккал/моль лиганда) достаточно хорошо совпадает со значениями энтальпии связывания, полученными для комплексов по типу интеркаляции ДНК – актиномицин D (-6-7) ккал/моль [21]). Константа связывания $K_2 = 1.4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, определенная из данных спектрофотометрии, также находится в хорошем согласии со значениями констант связывания для типичных интеркаляторов [22]. Поэтому мы полагаем, что второй тип комплексов, который образуется в системе ДНК – Act III - это интеркаляция лиганда в GC - пары. Значения термодинамических параметров плавления ДНК в области высоких P/D увеличиваются по сравнению с соответствующими значениями для свободной ДНК (табл. 1). Однако эти изменения невелики, поскольку относительное содержание ДНК в составе комплексов при данных P/D очень мало (рис. 3в). С этим связана и большая погрешность определения расчетных значений энтальпии $\delta\Delta H$ для смесей при P/D=37.8 (табл. 2), т.к. экспериментальное значение $\delta\Delta H$ находится в пределах ошибки.

В области P/D ≤ 5, в которой преобладают комплексы по 1-му типу связывания, форма кривой теплопоглощения (рис. 4, кривая 5) подобна форме кривой плавления ДНК с блочной структурой. Однако температура плавления каждого из блоков ДНК в комплексе, а также $T_{1/2}$, смещаются в высокотемпературную область на 33-36°C (рис. 4). Такой характер плавления можно объяснить тем, что

при $P/D \leq 5$ в основном образуется комплекс по внешнему типу связывания, предположительно с сахарофосфатным остовом, который неспецифичен к нуклеотидной последовательности. Тем не менее, определенная нами энтальпия связывания для этого типа комплексов ΔH_{cal} по величине заметно больше, чем энтальпия чисто электростатического взаимодействия, например, ионов щелочноземельных металлов с ДНК $(-3 \div 5)$ ккал/моль [25]. Дополнительный вклад в ΔH_{cal} могут также вносить формирующиеся на матрице ДНК агрегаты Act III, энтальпия образования которых близка по величине к энтальпии образования димеров производных актиноцина в водных растворах (-10) ккал/моль [12]. Однако полученное нами значение ΔH_{cal} существенно выше суммы энтальпий электростатического взаимодействия и агрегации. Завышенные значения ΔH_{cal} можно объяснить тем, что при оптимизации по уравнению 5 используются величины r_1 и r_2 , определенные из "спектрофотометрических" величин мест связывания, которые отражают термодинамическое состояние только тех нуклеотидов, которые непосредственно связаны с лигандом. Так, например, из зависимости относительных равновесных концентраций ДНК от P/D (рис. 3в, кривая 3) видно, что при $P/D=5$ в системе содержится довольно большое (до 25%) количество нуклеотидов, не связанных с лигандом. Однако на кривых теплопоглощения при этом значении P/D не наблюдается пика, соответствующего плавлению свободной ДНК (рис. 4а). Это свидетельствует о том, что величина "калориметрического" места связывания, показывающая число нуклеотидов, термодинамическое состояние которых изменяется при присоединении одной молекулы лиганда (n_{cal}) существенно больше, чем величина места связывания, полученная из спектрофотометрических концентрационных зависимостей. Ранее для комплексов Act III с двуспиральной $poly(rC)$ мы также отмечали, что величина "калориметрического" места связывания больше, чем величина места связывания, определенная методом спектрофотометрии [26].

При средних значениях P/D (8–12) кривая теплопоглощения размыта и уширена, однако на ней наблюдаются хорошо выраженные пики в области плавления GC-обогащенных участков ДНК с температурами, практически соответствующими температурам пиков для смеси при $P/D=5$ (рис. 4а). В данном интервале P/D два типа комплексов сосуществуют практически в равном количестве (рис. 3б). Как было показано выше, эти комплексы существенно различаются по термодинамическим характеристикам (табл. 1). Поэтому возможно, что лиганд, перешедший в раствор при плавлении менее термостабильного комплекса по типу интеркаляции, связывается не только с денатурированными участками ДНК [27], но и со спиральными, увеличивая концентрацию более термостабильных комплексов по типу агрегации. Такое перераспределение концентраций лиганда приводит к увеличению значения r_1 по сравнению со значением, полученным из спектрофотометрических концентрационных зависимостей при комнатной температуре (табл. 2). Это, в свою очередь, является еще одной причиной завышенного значения ΔH_{cal} , которое получено при оптимизации по уравнению 5.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В системе ДНК – Act III в зависимости от P/D образуются два типа комплексов, существенно различающихся по термодинамическим параметрам и структуре. При низких значениях P/D образуются комплексы, неспецифичные к нуклеотидной последовательности. Лиганд, взаимодействуя преимущественно с сахарофосфатным остовом с величиной места связывания $n_1=2 \pm 0.1$, образует агрегаты на матрице ДНК.

2. При высоких значениях P/D взаимодействие лиганда с матрицей ДНК происходит по типу интеркаляции и приводит к изменению структуры GC-обогащенных участков ДНК. Величины места связывания, определенные методами спектрофотометрии и калориметрии, существенно отличаются.

3. В области средних значений P/D , где сосуществуют оба типа комплексов, в процессе плавления происходит перераспределение лиганда, которое приводит к увеличению концентрации Act III в составе комплекса по типу агрегации. Для корректного описания термодинамики процесса плавления в данном интервале P/D необходимо учитывать изменение концентраций комплексов в зависимости от температуры, что требует дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukyan G.A., Karapetyan A.T. // *Experimental and Molecular Medicine*. 2001. Vol.33. No.4. P.205-208.
2. Barcelo F., Capo D., Portugal J. // *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol.30. No.20. P. 4567-4573.
3. Barcelo F., Ortiz-Lombardia M., Portugal J. // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2001. Vol.1519. P.175-184.
4. Sovenyazy K., Bolderon J., Petty J. // *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol.31. No.10. P. 2561-2569.
5. Карапетян А.Т., Пермогоров В.И., Франк-Каменетский М.Д., Лазуркин Ю.С. // *Молекулярная биология*. 1972. Т.6. Вып.6. С.867-874.
6. Borisova O.F., Shchyolkina A.K., Karapetyan A.T., Surovaya A.N. // *Mol. Biology*. 1998. Vol.32. No.5. P.718-724.

Влияние производного актиноцина Act III на плавление ДНК ...

7. Snyder J.G., et al. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1989. Vol.86. P.3968-3972.
8. Yoo H., Rill R.L. // J.Mol.Recognit. 2001. 14. P.145-150.
9. Chen F.-M., et al. // Biophys.J. 2003. Vol.84. P.432-439.
10. Chin K.-H., et al. // Nucleic Acids Research. 2003. Vol.31. No.10. P. 2622-2629.
11. Круглова Е.Б., Гладковская Н.А. // "Вісник Харківського Університету" №637, "Біофізичний Вісник". 2004. Вып.1-2 (14). С.43-47.
12. Anti-cancer Drug Design: Biological and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxazone Derivatives. Eds Veselkov A.N., Davies D.B. Sevastopol: SEVNTU Press. 2002. 259 p.
13. Круглова Е.Б., Гладковская Н.А., Малеев В.Я. // Биофизика. 2005. Т. 50. Вып.2. С. 253-264.
14. Круглова Е.Б., Малеев В.Я., Глибин Е.Н., Веселков А.Н. // "Вісник Харківського Університету" №560, "Біофізичний Вісник". 2002. Вып.1 (10). С.12-20.
15. Hinz H.-J., Schwarz F.P. // Pure Appl. Chem., Vol. 73, No. 4, pp. 745-759, 2001.
16. Круглова Е.Б., Ермак Е.Л. // "Вісник Харківського Університету" №560, "Біофізичний Вісник". 2003. Вып.1(12). С. 64-69.
17. Esposito D., Del Vicchio P., Barone G. // J.Am.Chem.Soc. 1997. Vol.119. No.11. P.2606-2613.
18. Marky L.A., Blumenfeld K.S., Breslauer K.J. // Nucleic Acids Research. Vol. 11, No.9, 1983, 2857-2870.
19. Marky L.A., Snyder J.G., Breslauer K.J. // Nucleic Acids Research. 1983. Vol.11. No.16. P.5701-5715.
20. Ахрем А.А., Ландо Д.Ю. // Молекулярная биология. 1981. Т.15. №5. С.1083-1091.
21. Chaires J.B. // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2006. 453. P.24-29.
22. Chaires J.B. // Biopolymers. 1998. Vol. 44. Issue 3. P.201-215.
23. Scott E.V., Jones R.L., Banville D.L., et al. // Biochemistry. 1988. Vol.27. No.3. P.915-923.
24. Scott E.Z., Zon G., Marzilli L.G., Wilson W.D. // Biochemistry. 1988. Vol.27. No.20. P.7940-7951.
25. Благой Ю.П., Галкин В.Л., Гладченко Г.О., Корнилова С.В., Сорокин В.А., Шкорбатов А.Г. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. К. Наукова думка. 1991. 270с.
26. Березняк Е.Г., Круглова Е.Б. и др. // Биофизика. 2007. Т.52. Вып.5. С.812-821.
27. Ландо Д.Ю., Иванова М.А., Ахрем А.А. // Молекулярная биология. 1980. Т.14. Вып.6. С.1281-1288.