

УДК 577.323

КОНКУРЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ХЛОРОФИЛЛИНА И ПРОФЛАВИНА С ДНК**А.А. Герус, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников***Институт радиопластики и электроники НАН Украины имени А.Я. Усикова, ул. Ак. Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина**e-mail: nastyona.ger@gmail.com*

Поступила в редакцию 15 ноября 2016 года

Принята 18 ноября 2016 года

Методом спектрофотометрии исследовано влияние хлорофиллина (Chln) на взаимодействие профлафина (Pf) с ДНК. С помощью метода выделения главных компонент проведена декомпозиция спектров систем Chln-Pf, Pf-ДНК и Chln-Pf-ДНК, полученных при различных относительных концентрациях ДНК и лигандов. Это позволило определить концентрации поглощающих частиц в растворах. По данным спектрофотометрии взаимодействие Chln с ДНК отсутствует. Константа гетероассоциации Chln с Pf, рассчитанная из изотермы Скотчарда, составляет 9×10^4 М. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в тройной системе Chln-Pf-ДНК хлорофиллин проявляет только интерцепторные свойства. Также проведены спектрофотометрические исследования двойных и тройных систем при нагревании растворов от 20 до 90 °С. Получены температурные зависимости концентраций поглощающих частиц в системе Chln-Pf-ДНК. Показано, что с ростом температуры интерцепторные свойства Chln усиливаются. Это связано с тем, что константа связывания Pf с ДНК при нагревании уменьшается, в то время как константа гетероассоциации Chln-Pf практически не зависит от температуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, хлорофиллин, профлафин, конкурентное связывание, протекторный механизм, интерцепторный механизм, спектрофотометрия.

COMPETITIVE BINDING OF CHLOROPHYLLIN AND PROFLAVINE TO DNA**A.A. Herus, N.A. Gladkovskaya, E.G. Bereznyak, E.V. Dukhopelnikov***O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NASU, 12 Ak. Proskura Str., Kharkov, 61085, Ukraine*

The effect of chlorophyllin (Chln) on the DNA-proflavine (Pf) interactions has been investigated by spectrophotometry. The absorption spectra were recorded at different DNA-to-ligand molar ratios. Decomposition of the spectra of the Chln-Pf, Pf-DNA and Chln-Pf-DNA mixtures was performed by the principal component analysis, allowing determining the concentrations of the absorbing particles in solutions. The results indicated that chlorophyllin did not interact with DNA. The Chln-Pf heteroassociation constant ($K=9 \times 10^4$ M) was calculated using Scatchard isotherm analysis. Furthermore, Chln showed only the interceptor properties in the ternary Chln-Pf-DNA system. Next, spectrophotometric studies of binary and ternary systems were carried out under heating of the solutions from 20 to 90 °C. Temperature dependences of the particle concentrations were obtained for Chln-Pf-DNA system. It appeared that Chln interceptor properties increased with the temperature. This is due to the fact that Pf-DNA binding constant decreased under heating, while Chln-Pf heteroassociation constant did not vary significantly with the temperature.

KEY WORDS: DNA, chlorophyllin, proflavine, competitive binding, protector mechanism, interceptor mechanism, spectrophotometry.

КОНКУРЕНТНЕ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ХЛОРОФІЛІНУ ТА ПРОФЛАВІНУ З ДНК**А.А. Герус, Н.О. Гладковська, К.Г. Березняк, Є.В. Духопельников***Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я.Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна*

Методом спектрофотометрії досліджено вплив хлорофіліну (Chln) на взаємодію профлавіну (Pf) з ДНК. За допомогою методу виділення головних компонент проведено декомпозицію спектрів систем Chln-Pf, Pf-ДНК та Chln-Pf-ДНК, які було отримано при різних концентраціях ДНК і лігандів. Це дозволило визначити концентрації поглинаючих частинок у розчинах. За даними спектрофотометрії взаємодія Chln з ДНК відсутня. Константа гетероасоціації Chln з Pf, що розрахована з ізотерми Скотчарда, становить 9×10^4 М. Отримані результати свідчать про те, що у потрійній системі Chln-Pf-ДНК хлорофілін виявляє тільки інтерцепторні властивості. Також було проведено спектрофотометричні дослідження подвійних і потрійних систем при нагріванні розчинів від 20 до

90 °С. Отримано температурні залежності концентрації поглинаючих частинок у системі Chln-Pf-ДНК. Показано, що зі зростанням температури інтерцепторні властивості Chln посилюються. Це пов'язано з тим, що константа зв'язування Pf з ДНК при нагріванні зменшується, тоді як константа гетероасоціації Chln-Pf практично не залежить від температури.

КЛЮЧЕВІ СЛОВА: ДНК, хлорофілін, профлавін, конкурентне зв'язування, протекторний механізм, інтерцепторний механізм, спектрофотометрія.

Лекарственные препараты наряду с желательным фармакологическим действием могут проявлять побочные эффекты, возникающие вследствие их накопления в организме и передозировки. Также серьезную проблему для фармакологии и медицины представляют попадающие в организм из окружающей среды мутагены и высокотоксичные соединения. Перспективным способом снижения токсичности является введение в организм лигандов-конкурентов, молекулярные механизмы действия которых основаны на интерцепторных и/или протекторных свойствах. Интерцепторный механизм заключается в способности лиганда-конкурента снижать концентрацию токсичного соединения, образуя с ним стабильные гетерокомплексы. Суть протекторного механизма состоит в конкуренции двух лигандов за места посадки на молекуле-мишени, в частности ДНК, приводящей к вытеснению мутагена лигандом-конкурентом. В результате оба процесса приводят к уменьшению доли токсичного препарата, связанного с молекулой-мишенью, и, соответственно, к снижению его негативного действия.

В данной работе исследовано конкурентное действие хлорофиллина (Chln) на связывание профлафина (Pf) с ДНК.

Мутаген акридинового ряда профлафин обладает антибактериальной и противовирусной активностью, которая связана с ДНК-связывающей способностью [1, 2]. В то же время интеркаляция Pf в ДНК индуцирует мутации, приводя к ошибкам при ее рекомбинации и генетической репарации.

Хлорофиллин представляет собой нетоксичное водорастворимое производное хлорофилла, которое является объектом многочисленных исследований вследствие его антимуtagenных и антиоксидантных свойств [3-5]. Показано, что Chln защищает клетки от мутагенных эффектов бензо- α -пирена [4, 6], циклофосамида [6], гетероциклических аминов [7, 8], афлатоксина [9], тяжелых металлов [10] и ионизирующего излучения [11]. Для нейтрализации действия мутагенов Chln способен проявлять разные механизмы, в том числе и реализовывать конкурентные свойства в системах Chln-мутаген-ДНК. Интерцепторный механизм конкуренции Chln обусловлен взаимодействием между его пиррольным ядром и ароматической системой молекул мутагенов [12-14]. Показано, что Chln образует стойкие гетерокомплексы с акридиновым оранжевым, ICR-191 и доксорубицином с константами ассоциации $7,0 \times 10^5$, $3,0 \times 10^5$ и $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, соответственно [15, 16]. Способность хлорофиллина связываться с ДНК и проявлять протекторные свойства является предметом дискуссий [17-19]. В работах [17, 19] была получена величина константы связывания Chln с ДНК, равная $(10^3-10^4) \text{ M}^{-1}$, при этом другие авторы [18] указывали на очень слабое взаимодействие хлорофиллина с ДНК и на невозможность определения константы взаимодействия в рамках того концентрационного диапазона, в котором проводился эксперимент по титрованию.

Целью данной работы было исследование механизмов конкурентного действия хлорофиллина в системе Chln-Pf-ДНК. Исследования двойных систем Chln-Pf, Chln-ДНК, Pf-ДНК и тройной системы Chln-Pf-ДНК проводились методом спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы коммерческая ДНК из молок лосося фирмы "Serva", а также профлавин и хлорофиллин фирмы "Sigma" без дополнительной очистки. Структурные формулы Pf и Chln приведены на рис. 1.

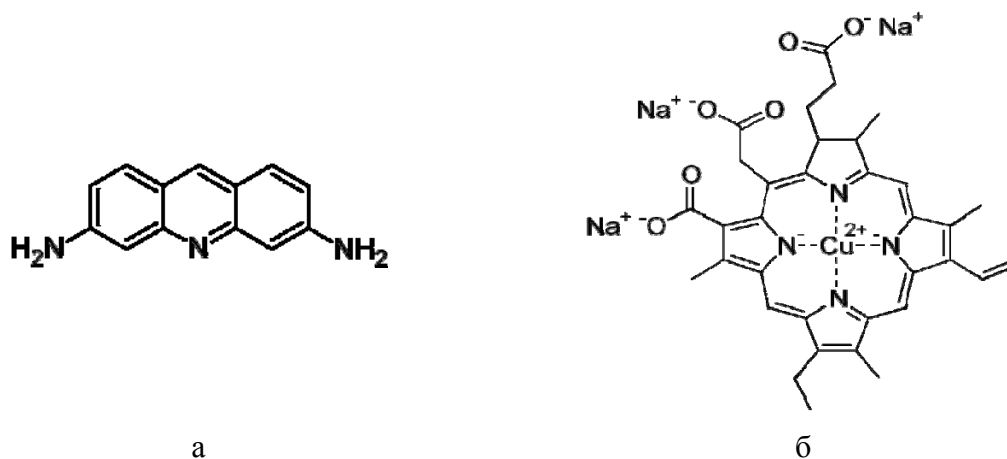


Рис. 1. Структурные формулы профлавина (а) и хлорофиллина (б).

Измерения проводились в видимой области спектра на спектрофотометре "Specord M40" (Германия) в фосфатном буферном растворе ($2,5 \times 10^{-3}$ М KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-3}$ М Na_2HPO_4 , pH = 6,86) при значении ионной силы $I = 0,025$ М.

Система Chln-ДНК исследовалась методом спектрофотометрического титрования в широком диапазоне соотношения концентраций реагирующих компонентов ($C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 0,5 \div 70$) при постоянной концентрации лиганда.

Спектры системы Chln-Pf были получены как при постоянной концентрации Chln, так и при постоянной концентрации Pf (прямое и обратное титрование).

Температурные исследования двойных и тройных систем ДНК-лиганд(ы) проводились при следующих значениях соотношений концентраций реагирующих компонентов: $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 10$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 15$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Pf}} = 10$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Pf}} = 15$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Pf}} = 20$. При исследовании влияния температуры на устойчивость гетерокомплексов использовались растворы с соотношениями концентраций компонентов: $C_{\text{Pf}}/C_{\text{Chln}} = 1$, $C_{\text{Pf}}/C_{\text{Chln}} = 0,75$, $C_{\text{Pf}}/C_{\text{Chln}} = 0,5$.

Спектры поглощения исследованных смесей были получены в температурном интервале 20-90 °С с использованием проточного термостатируемого 6-ти позиционного кюветодержателя. Для достижения равновесия исследуемые растворы выдерживались в каждой температурной точке в течение 10 минут. Точность измерения температур составляет 0,5 °С.

При определении концентраций ДНК и лигандов использовались следующие значения молярных коэффициентов экстинкции: для ДНК (в молях фосфатов) $\epsilon_{260} = 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20], для профлавина $\epsilon_{445} = 4,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [21], для хлорофиллина $\epsilon_{402} = 3,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [18]. Точность измерения поглощения составляет 0,005 оптических единиц.

Для анализа полученных экспериментальных данных был использован метод выделения главных компонент SVD-ALS [22]. Этот метод позволяет получить базовые спектры всех поглощающих частиц в исследуемой системе и определить их относительные вклады в результирующий спектр [23]. Декомпозиция была реализована в программе "The Unscrambler".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимым условием существования протекторного механизма является способность конкурента образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами. Интерцепторный механизм проявляется при наличии гетероассоциации между лигандами. Преобладание того или другого механизма конкуренции в тройной системе определяется величинами констант взаимодействия лигандов с ДНК и константой гетероассоциации.

Ранее из кривых спектрофотометрического титрования нами была рассчитана константа комплексообразования Pf с ДНК ($5,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) [24]. Это значение коррелирует с данными, полученными в работе [25].

Результаты спектрофотометрических титрований в системе Chln-ДНК, проведенных в широком диапазоне соотношения концентраций реагирующих компонентов, показали, что даже при высоких относительных концентрациях хлорофиллина ($C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 0,5$) добавление ДНК не приводит к изменению спектра лиганда (данные не приведены). Полученные результаты подтверждают вывод, сделанный авторами работы [18], об отсутствии взаимодействия хлорофиллина с ДНК. Таким образом, хлорофиллин не конкурирует с профлавином за места посадки на ДНК и не проявляет протекторные свойства.

Для того, чтобы оценить интерцепторные свойства Chln за счет образования гетерокомплексов с молекулами Pf, нами были проведены эксперименты по прямому и обратному титрованию в системе Chln-Pf. На рис. 2, а представлены спектры, полученные при следующих значениях концентраций реагирующих компонентов: $C_{\text{Pf}} = 2,02 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Chln}} = (0 \div 0,84) \times 10^{-5} \text{ M}$ и $C_{\text{Chln}} = 1,51 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Pf}} = (0 \div 1,13) \times 10^{-5} \text{ M}$. Видно, что изменение соотношения концентрации лигандов приводит к существенным изменениям в спектрах. При этом результирующие спектры поглощения не являются суперпозицией спектров отдельных лигандов, взятых в соответствующих концентрациях, что свидетельствует о взаимодействии Chln с Pf.

Для определения константы гетероассоциации была проведена декомпозиция спектров системы Chln-Pf (рис. 2, б) и получены базовые спектры трех по-разному поглощающих частиц: 1 – чистый Chln ($\lambda_{\text{max}} = 402 \text{ нм}$), 2 – чистый Pf ($\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ нм}$), 3 – гетерокомплекс Chln-Pf ($\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ нм}$).

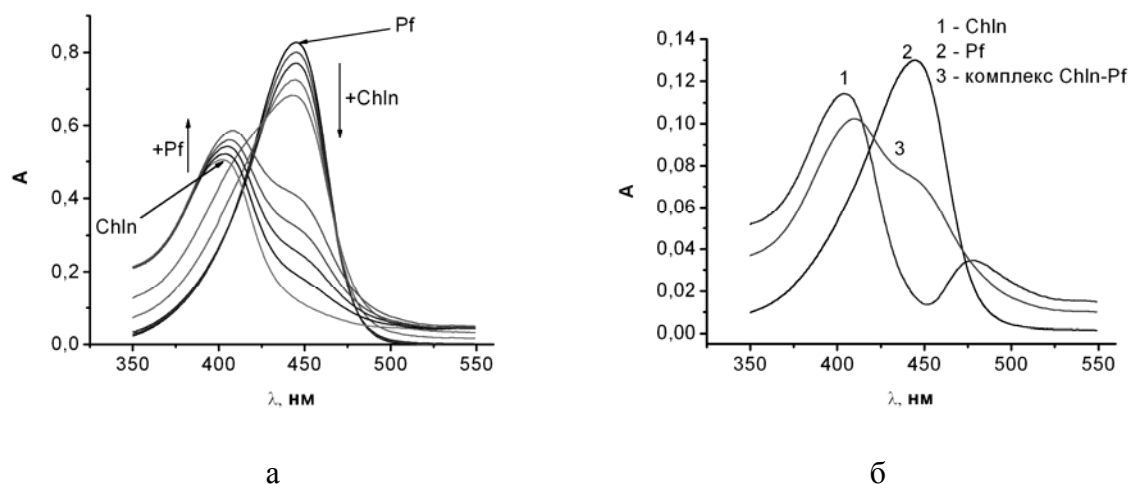


Рис. 2. Спектры поглощения системы Chln-Pf при различных соотношениях концентраций реагирующих компонентов (а). Базовые спектры поглощающих частиц в системе Chln-Pf (б).

Также были определены относительные вклады спектров этих частиц в экспериментальные спектры, что позволило построить изотерму связывания в координатах Скетчарда (рис. 3). Аппроксимация полученной зависимости проводилась по уравнению:

$$\frac{r}{C_{Pf, free}} = K_{bind} (1 - nr) \quad (1)$$

где K_{bind} – константа связывания лигандов; r – количество связанных молекул Chln на одну молекулу Pf; $C_{Pf, free}$ – равновесная концентрация свободного Pf; n – величина места связывания.

Рассчитанная величина константы связывания в системе Chln-Pf составила $\sim 9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Образование гетерокомплекса происходит со стехиометрией 1:1.

Таким образом, в системе Chln-Pf-ДНК преобладает интерцепторный механизм конкуренции, что обусловлено высоким значением константы гетероассоциации Chln-Pf и малым сродством Chln к ДНК по сравнению с таковым для Pf.

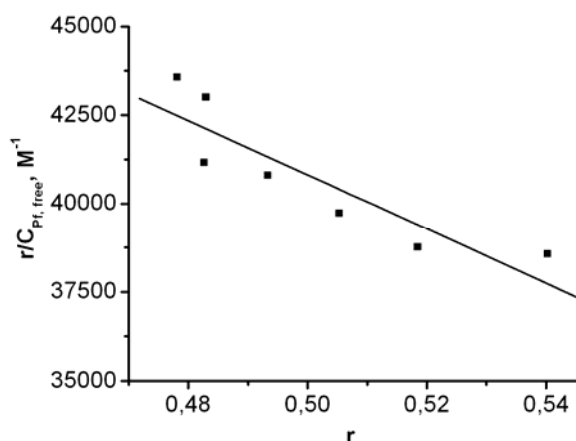


Рис. 3. Изотерма связывания хлорофиллина с профлавином в координатах Скетчарда.

Для детального исследования механизма интерцепторного действия хлорофиллина в работе было проведено спектрофотометрическое исследование влияния температуры на двойные системы Chln-ДНК, Chln-Pf, Pf-ДНК и тройную систему Chln-Pf-ДНК.

Установлено, что повышение температуры не приводит к спектральным изменениям в системе Chln-ДНК, где, как было показано выше, отсутствует взаимодействие между компонентами. При нагревании раствора Chln-Pf также не наблюдаются значимые изменения в спектрах. Это свидетельствует о том, что при повышении температуры гетерокомплекс не разрушается. Таким образом, константа связывания Chln с Pf практически не зависит от температуры, следовательно, энтальпия образования данного комплекса близка к нулю.

На рис. 4, а представлены спектры поглощения системы Pf-ДНК ($C_{ДНК}/C_{Pf} = 10$) в интервале температур 20-90 °С. Спектр поглощения системы Pf-ДНК при увеличении температуры приближается к спектру чистого Pf и при 90 °С практически с ним совпадает. Следовательно, комплекс Pf-ДНК при нагревании разрушается.

Форма спектра поглощения тройной системы Chln-Pf-ДНК существенно изменяется при нагревании. Это видно из рис. 4, б, где для примера приведены результаты температурных измерений при следующих относительных концентрациях компонентов в системе: ($C_{ДНК}/C_{Pf} = 10$, $C_{ДНК}/C_{Chln} = 15$). Наблюдаемые изменения могут быть вызваны температурным разрушением присутствующих в растворе комплексов и/или перераспределением лигандов между ними.

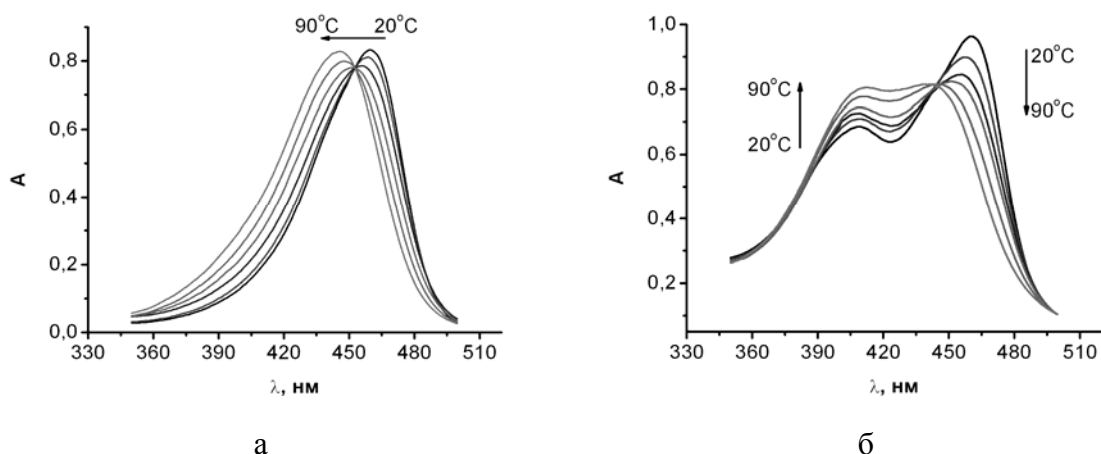


Рис. 4. Спектры поглощения систем Pf-ДНК (а) и Chln-Pf-ДНК (б), полученные в температурном интервале 20-90 °С. Измерения проводились при следующих значениях концентраций: $C_{\text{ДНК}}=2,47 \times 10^{-4}$ М, $C_{\text{Pf}}=2,43 \times 10^{-5}$ М, $C_{\text{Chln}}=1,61 \times 10^{-5}$ М.

Для систем Pf-ДНК и Chln-Pf-ДНК была проведена декомпозиция спектров, полученных при различных соотношениях концентраций реагирующих компонентов в интервале температур 20-90 °С. Использование широкого набора экспериментальных данных позволило однозначно определить базовые спектры поглощающих частиц.

В системе Pf-ДНК в исследованном температурном диапазоне присутствуют две частицы – свободный профлавин ($\lambda_{\text{max}} = 445$ нм) и комплекс Pf-ДНК ($\lambda_{\text{max}} = 465$ нм) (рис. 5, а). В системе Chln-Pf-ДНК выделены базовые спектры четырех частиц (рис. 5, б). Кривые 1, 2 и 3 практически совпадают по длинам волн с базовыми спектрами Chln, Pf и гетерокомплекса Chln-Pf, полученными при анализе результатов титрования в системе Chln-Pf (рис. 2, б). Кривая 4 имеет максимум поглощения $\lambda_{\text{max}} = 465$ нм, что соответствует базовому спектру комплекса Pf-ДНК (рис. 5, а, кривая 2).

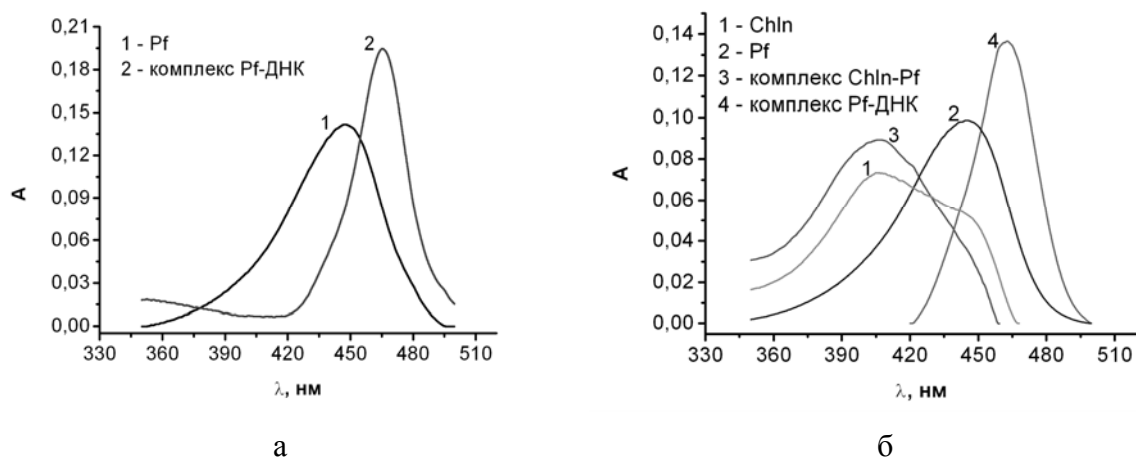


Рис. 5. Базовые спектры поглощающих частиц в системах Pf-ДНК (а) и Chln-Pf-ДНК (б).

Для того, чтобы проследить за поведением тройной системы Chln-Pf-ДНК при нагревании, были получены зависимости концентраций поглощающих частиц от температуры (рис. 6). Видно, что при комнатной температуре Pf преимущественно связывается с ДНК – концентрация комплекса Pf-ДНК практически в 5 раз выше, чем гетерокомплекса. Соотношение концентраций комплексов Pf-ДНК и Chln-Pf

коррелирует с соотношением констант их образования. Также в суммарный спектр вносит существенный вклад поглощение свободного Chln.

При нагревании разрушение комплекса Pf-ДНК сопровождается увеличением концентрации комплекса Chln-Pf. В температурном интервале до 70 °С такие процессы вызваны различиями в температурных зависимостях констант связывания – константа связывания Pf с ДНК уменьшается при нагревании, а константа гетероассоциации практически не зависит от температуры. Таким образом, при повышении температуры интерцепторные свойства Chln усиливаются.

При температурах 70-90 °С наклон кривых резко увеличивается (рис. 6). В этом температурном интервале происходит кооперативный процесс плавления ДНК, сопровождающийся разрушением комплекса Pf-ДНК и переходом связанного лиганда в свободное состояние [26]. Из рис. 6 наглядно видно, что освободившийся Pf связывается с Chln, что приводит к уменьшению концентрации свободного Chln (рис. 6, кривая 1) и увеличению концентрации гетерокомплекса (рис. 6, кривая 3). При избытке профлавина (соотношение концентраций лигандов в исследованной системе составляло $C_{Pf}/C_{Chln} = 1,5$) концентрация свободного Pf также возрастает (рис. 6, кривая 2).

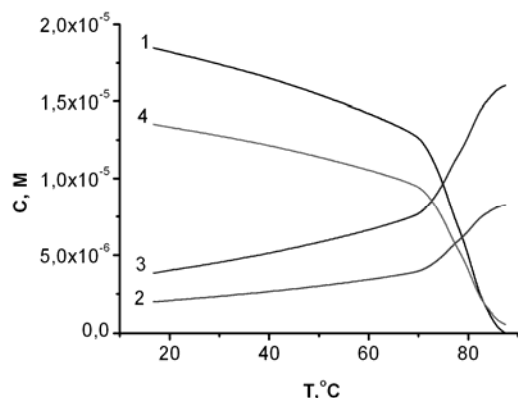


Рис. 6. Зависимости от температуры концентраций поглощающих частиц в системе Chln-Pf-ДНК: 1 - Chln, 2 - Pf, 3 - гетерокомплекс Chln-Pf, 4 - комплекс Pf-ДНК. Соотношение концентраций в системе Chln-Pf-ДНК: $C_{ДНК}/C_{Chln}=15$, $C_{ДНК}/C_{Pf}=10$.

ВЫВОДЫ

Методом спектрофотометрии исследовано влияние хлорофиллина на взаимодействие профлавина с ДНК. Показано, что Chln не взаимодействует с ДНК, а константа гетероассоциации Chln с Pf, рассчитанная из изотермы Скетчарда, составляет 9×10^4 М. Это свидетельствует о том, что основным механизмом конкурентного действия хлорофиллина в тройной системе Chln-Pf-ДНК является интерцепция. Протекторные свойства хлорофиллин практически не проявляет.

При повышении температуры наблюдается усиление интерцепторных свойств Chln, поскольку константа связывания Pf с ДНК уменьшается при нагревании, а константа гетероассоциации не зависит от температуры.

Таким образом, наши данные подтверждают перспективность использования хлорофиллина в качестве интерцептора, который способен снижать негативное действие мутагенов и токсичных веществ на ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial activity of 9-oxo and 9-thio acridines: correlation with intercalation into DNA and effects on macromolecular biosynthesis / A. Cremieux, J. Chevalier, D. Sharples [et al.] // *Res Microbiol.* – 1995. – V. 146. – № 1. – P. 73-83.
2. Carlson C. B. Solid-phase synthesis of acridine-based threading intercalator peptides / C. B. Carlson, P. A. Beal // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2000. – V. 10, N 17. – P. 1979-1982.
3. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer / P. A. Egner, J. B. Wang, Y. R. Zhu [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – V. 98, N 25. – P. 14601-14606.

4. The importance of carcinogen dose in chemoprevention studies: quantitative interrelationships between, dibenzo[a,l]pyrene dose, chlorophyllin dose, target organ DNA adduct biomarkers and final tumor outcome / M. M. Pratt, A. P. Reddy, J. D. Hendricks [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2007. – V. 28, N 3. – P. 611-624.
5. Chlorophyllin Antimutagenesis Mechanisms under Different Treatment Conditions in the Micronucleus Assay in V79 Cells / L. G. L. Rampazo, B. Q. Jordao, V. E. P. Vicentini, M. S. Mantovani // *Cytologia*. – 2002. – V. 67, N 3. – P. 323-327.
6. Protective effect of curcumin and chlorophyllin against DNA mutation induced by cyclophosphamide or benzo[a]pyrene / M. A. Ibrahim, A. M. Elbehairy, M. A. Ghoneim, H. A. Amer // *Z Naturforsch C*. – 2007. – V. 62, N 3-4. – P. 215-222.
7. Hernaez J. Effects of tea and chlorophyllin on the mutagenicity of N-hydroxy-IQ: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation, and degradation/scavenging of the active metabolites / J. Hernaez, M. Xu, R. Dashwood // *Environ Mol Mutagen*. – 1997. – V. 30, N 4. – P. 468-474.
8. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines / C. E. Schwab, W. W. Huber, W. Parzefall [et al.] // *Crit Rev Toxicol*. – 2000. – V. 30. - №1. – P. 1-69.
9. Egner P. A. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin / P. A. Egner, A. Munoz, T. W. Kensler // *Mutat Res*. – 2003. – V. 523-524. – P. 209-216.
10. Garcia-Rodriguez M. C. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood / M. C. Garcia-Rodriguez, V. Lopez-Santiago, M. Altamirano-Lozano // *Mutat Res*. – 2001. – V. 496, N 1-2. – P. 145-151.
11. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action / S. S. Kumar, R. C. Chaubey, T. P. Devasagayam [et al.] // *Mutat Res*. – 1999. – V. 425, N 1. – P. 71-79.
12. Adsorption of mutagens to chlorophyllin-chitosan, an insoluble form of chlorophyllin / S. Arimoto-Kobayashi, N. Harada, R. Tokunaga [et al.] // *Mutat Res*. – 1997. – V. 381, N 2. – P. 243-249.
13. Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis / H. Hayatsu, C. Sugiyama, S. Arimoto-Kobayashi, T. Negishi // *Cancer Lett*. – 1999. – V. 143, N 2. – P. 185-187.
14. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity / S. Arimoto, S. Fukuoka, C. Itome [et al.] // *Mutat Res*. – 1993. – V. 287, N 2. – P. 293-305.
15. Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy / M. Pietrzak, Z. Wiczorek, A. Stachelska, Z. Darzynkiewicz // *Biophys Chem*. – 2003. – V. 104, N 1. – P. 305-313.
16. Attenuation of acridine mutagen ICR-191--DNA interactions and DNA damage by the mutagen interceptor chlorophyllin / M. Pietrzak, H. D. Halicka, Z. Wiczorek [et al.] // *Biophys Chem*. – 2008. – V. 135, N 1-3. – P. 69-75.
17. Neault J. F. Structural analysis of DNA-chlorophyll complexes by Fourier transform infrared difference spectroscopy / J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi // *Biophys J*. – 1999. – V. 76, N 4. – P. 2177-2182.
18. The "interceptor" properties of chlorophyllin measured within the three-component system: intercalator-DNA-chlorophyllin / M. Pietrzak, Z. Wiczorek, J. Wiczorek, Z. Darzynkiewicz // *Biophys Chem*. – 2006. – V. 123, N 1. – P. 11-19.
19. Tajmir-Riahi H. A. DNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin as antimutagenic agents: synthesis, stability, and structural features / H. A. Tajmir-Riahi, J. F. Neault, S. Diamantoglou // *Methods Mol Biol*. – 2004. – V. 274. – P. 159-171.
20. Barcelo F. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA / F. Barcelo, D. Capo, J. Portugal // *Nucleic Acids Res*. – 2002. – V. 30, N 20. – P. 4567-4573.
21. Dourlent M. A quantitative analysis of proflavine binding to polyadenylic acid, polyuridylic acid, and transfer RNA / M. Dourlent, C. Helene // *Eur J Biochem*. – 1971. – V. 23, N 1. – P. 86-95.
22. *Multivariate Data Analysis: In Practice : an Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design* / K. H. Esbensen, D. Guyot, F. Westad, L. P. Houmoller: CAMO Software, 2002. – 598 p.
23. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: a flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novantrone, doxorubicin, ellipticine, and the doxorubicin analogue AD198 / F. Traganos, J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz // *Cancer Res*. – 1991. – V. 51, N 14. – P. 3682-3689.
24. Peculiarities of DNA-proflavine binding under different concentration ratios / E. G. Bereznyak, N. A. Gladkovskaya, A. S. Khrebtova [et al.] // *Biophysics*. – 2009. – V. 54, N 5. – P. 574-580.
25. Basu A. Thermodynamic characterization of proflavine–DNA binding through microcalorimetric studies / A. Basu, G. Suresh Kumar // *The Journal of Chemical Thermodynamics*. – 2015. – V. 87. – P. 1-7.
26. Determination of ligand to DNA binding parameters from two-dimensional DSC curves / E. V. Dukhopelnikov, E. G. Bereznyak, A. S. Khrebtova [et al.] // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2013. – V. 111, N 3. – P. 1817-1827.