

RAPORT DE FAZA 2011, SINTEZA – 12 decembrie 2011

Proiect PNII Idei 1138/2009

Obiectivele științifice ale fazei:

1. Studiul efectelor unor flavonoizi asupra relației stress oxidativ - proliferare/apoptoză
2. Studiul efectelor unor flavonoizi asupra semnalizării prin calciu
3. Studiul efectelor unor flavonoizi asupra relației între luminescența întârziată și proliferare/viabilitate/ apoptoză în condiții de stress oxidativ

Studiul efectelor unor flavonoizi asupra relației stress oxidativ - proliferare/apoptoză

Epigallocatechin-3-gallatul (EGCG) și quercetina (QC; 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavona) sunt doi flavonoizi care pot inhiba proliferarea celulară și induce apoptoza în diferite tipuri de cancer [1-6]. Atât EGCG cât și QC pot exercita un efect dual, pro- și anti-oxidant, depinzând de doza și durata tratamentului și numeroase studii indică faptul că celulele maligne sunt mult mai susceptibile decât celulele normale la citotoxicitatea acestor doi flavonoizi [2,4-6]. De aceea, această proprietate poate fi folosită pentru a preveni leucemia sau pentru a crește eficiența chimioterapiei în leucemie. În etapele anterioare ale acestui proiect am studiat efectele quercetinei în combinație cu un agent chimioterapeutic clinic important în tratamentul leucemiei, menadiona (MD)(vitamina K₃) [7], care poate devia fluxul de electroni de la Complexul I al lanțului respirator mitocondrial (MRC) [8] producând în acest mod mari cantități de superoxid. MD, peroxidul de hidrogen, QC și EGCG pot activa programul apoptotic pe calea mitocondrială dependentă de Ca²⁺ [1-10].

În această etapă a proiectului prezentăm date noi, obținute prin măsurători efectuate asupra limfoblaștilor de leucemie umană, Jurkat T, date care pot ajuta la stabilirea corectă a dozelor de suplimente de EGCG ori quercetină țintind atât prevenirea cancerului cât și tratamentul leucemiei pe baza de MD. Astfel, am continuat și completat o serie de experimente începute în etape anterioare și am inițiat experimente privind efectele EGCG asupra relației stress oxidativ-proliferare/apoptoză. Rezultatele obținute în cercetările efectuate asupra efectelor celor doi flavonoizi au fost comparate cu efectul iradierii cu protoni a celulelor Jurkat T de leucemie umană, obiectul investigațiilor noastre.

Metoda de lucru a fost descrisă în detaliu în raportul științific al proiectului din anul 2009. Pe scurt, am efectuat măsurători de viabilitate celulară prin colorare cu albastru tripan, iar apoptoza și ciclul celular au fost determinate prin evaluare la citofluorimetru în flux prin marcarea probei celulare cu iodura de propidiu. Am efectuat aceste măsurători pe culturi celulare de limfoblaști umani Jurkat menținuți în cultura în suspensie, în mediu Mega-Cell RPMI 1640 suplimentat cu 5% ser fetal bovin inactivat termic, 100 U/ml penicilină și 100 μg/ml streptomycină. Pentru măsurători de ROS am utilizat indicatorul fluorescent MitoSOX Red, care se acumulează specific în mitocondrii, iar în prezența radicalului liber superoxid (O₂^{-•}) fluoroforul este oxidat și emite fluorescent în domeniul lungimilor de undă de 580-600 nm, cu excitare la 380-400 nm. Protocolul de lucru este similar celui pentru determinarea concentrației de Ca²⁺.

Toate măsurătorile spectrofluorimetrice au fost efectuate la 37°C.

Quercetina a indus apoptoza în celulele Jurkat într-o manieră dependentă de doză și de timp (Fig. 1). 50 μM QC aplicată timp de 1 h sau 24 h au produs la 48 h după tratament o rată apoptotică de 14.1 ± 2.1% și 81.3 ± 2.0%, respectiv, comparat cu rata corespunzătoare de 7.4 ± 2.2% în celulele control. QC a oprit celulele Jurkat în faza G₂/M și acest blocaj este reversibil (detalii în raportul *in*

extenso). În plus, datele sugerează că după tratamentul cel mai sever (50 μ M QC timp de 24 h) o parte a celulelor oprite în faza G₂/M au inițiat cel mai probabil apoptoza după o zi.

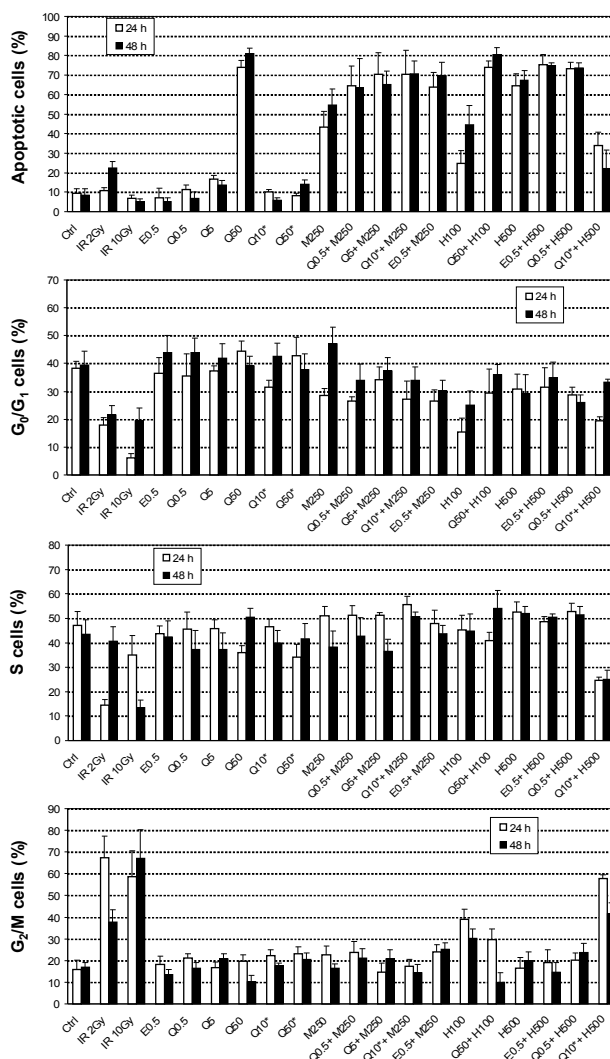


Fig. 1: Apoptoza și distribuțiile în ciclul celular la 24 și 48 h după tratamentul celulelor Jurkat cu 0.5, 5 ori 50 μ M QC timp de 24 h (Q0.5, Q5, Q50), 10 ori 50 μ M QC timp de 1 h (Q10*, Q50*), 0.5 μ M EGCG timp de 24 h (E0.5), 250 μ M MD timp de 20 min. (M250), 100 ori 500 μ M H₂O₂ timp de 20 min. (H100 or H500), ori după tratamente combinate (pre-incubare cu QC ori EGCG urmată de adăugarea a 250 μ M MD sau 100/500 μ M H₂O₂ timp de 20 min.), și după iradiere cu 2 Gy sau 10 Gy protoni (IR 2Gy, IR 10Gy).

Menadiona (250 μ M) aplicată timp de 20 min. a produs o apoptoză consistentă și a oprit ciclul celular în G₂/M în primele 24 h după tratament (Fig. 1). O accentuare semnificativă a apoptozei induse de MD a fost obținută prin pre-incubarea celulelor Jurkat cu 5 μ M QC sau 0.5 μ M EGCG timp de 24 h, și cu 10 μ M QC timp de 1 h, dar nu cu 0.5 μ M QC pentru 24 h. Mai mult, în combinația EGCG-MD blocajul G₂/M a persistat chiar și după 48 h de la tratament. Se poate, deci, afirma că apoptoza indusă de H₂O₂ a fost semnificativ întărită la pre-incubarea cu 0.5 μ M EGCG timp de 24 h, în timp ce o incubare scurtă cu 10 μ M QC timp de 1 h a exercitat un efect protector față de H₂O₂. Într-o cercetare privind efectele protectoare ale QC, am arătat că aceasta exercită un efect protector și față de inserția metalelor grele în bistraturile lipidice artificiale [11]. Iradierea cu protoni cu o doză de 2 Gy dar nu cu 10 Gy a produs o creștere semnificativă a ratei apoptotice la 48 h după iradiere (Fig. 1). Totuși, ambele doze au blocat consistent ciclul celular în faza G₂/M până la 24 h după iradiere, sugerând prezența unei lezări severe a ADN (Fig. 1). S-a produs o scădere consistentă a fracțiunii celulare G₂/M la 48 h după iradierea cu doza de 2 Gy dar nu cu 10 Gy, sugerând că o

parte a celulelor care au primit doza de protoni de 2 Gy a fost capabilă să inițieze apoptoza de la oprirea fazei G₂/M pe când cele care au primit 10 Gy au fost prea lezate pentru a declanșa apoptoza.

Am investigat, de asemenea, efectele quercetinei (QC) asupra viabilității celulare și metabolismului mitocondrial în sistemul celular Jurkat. Am efectuat măsurători experimentale pentru evaluarea supraviețuirii celulare clonogene a celulelor Jurkat în urma unui tratament de 1 h cu 25, 50, 100 și 150 μM QC. Pentru fiecare doză am determinat supraviețuirea clonogenă într-un număr de câte 3 măsurători, fiecare efectuată în duplicat, obținând valorile medii de 64.3 ± 12.4, 53.9 ± 5.6, 44.8 ± 2.6 și respectiv 42.3 ± 8.6. Am fitat datele cu o ecuație exponențială și am obținut doza de flavonoid care reduce supraviețuirea clonogenă la 50%, respectiv $D_{50\%} = 100.3 \mu\text{M}$ (Fig. 2).

Am efectuat măsurători spectrofluorimetrice de determinare a modificării nivelului de superoxid mitocondrial și a celui de NADH intracelular în celule Jurkat în urma expunerii timp de 90 min. la o doză de 10 μM quercetină. Celulele au fost marcate cu fluoroforul MitoSOX Red (5 μM, 15 min. la 37°C). S-a obținut o creștere marcantă a nivelului de superoxid mitocondrial, cu un maxim atins după cca. 30 min., urmată de o perioadă de revenire gradată la nivelul inițial. Concentrația intracelulară de NADH a scăzut semnificativ de cca. 2 ori, într-un interval scurt (cca. 1 min.) de la adăugarea quercetinei în suspensia celulară și apoi a rămas constantă pe întreaga perioadă de înregistrare de 90 min.

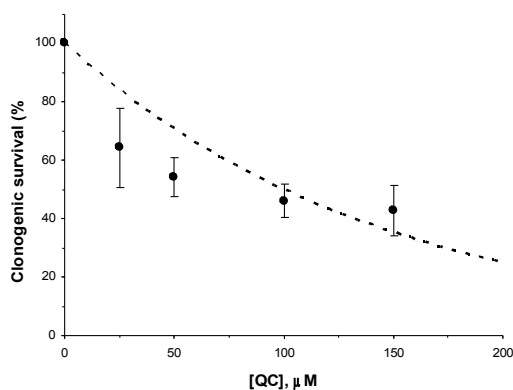


Fig. 2. Supraviețuirea clonogenă a celulelor Jurkat tratate cu quercetină timp de 1 h la dozele indicate. Sunt reprezentate media și deviația standard obținute din 3 determinări. Datele au fost fitate cu o ecuație exponențială (linia punctată) de forma $S(D) = 100 \exp(-D/D_0)$.

Rezultatele au fost acceptate spre publicare în 2 reviste din străinătate cotate BDI [12,13].

Bibliografie

1. Rasola A, Geuna M. 2001. *Cytometry* 45: 151-157
2. Yin W et al. 2009. *Biochem Pharmacol.* 78: 191-202
3. Verkhovskaya ML et al. 2008. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 3763-3767
4. L.D. Gaspers, A.P. Thomas, *Methods* **46**, 224 – 232 (2008)
5. J. Eng, R.M. Lynch, R.S. Balaban, *Biophys. J.* **55**, 621 – 630 (1989)
6. M.A. Pérez-Pinzón et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 215 – 221 (1998)
7. Goltsev V et al. 2005. *Photosynth Res.* 84: 209-215
8. Guo Y, Tan J. 2009. *BioSystems.* 95: 98-103
9. Hídeg E et al. 1991. *BBA - Bioenerg.* 1098: 27-31
10. Felker P et al. 1973. *BBA - Bioenerg.* 325: 193-196
11. A. Popescu et al., *Rom. J. Biophys.* 2011 21(3):167-178
12. Baran, I., C. Ganea, et al., *Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud*, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561
13. Baran, I., C. Ganea, et al., *Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud*, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561

Studiul efectelor unor flavonoizi asupra semnalizării prin calciu

Într-un studiu anterior [1] am arătat că QC induce apoptoza în acest sistem celular într-o manieră dependentă de timp și de doză. În acest studiu ne-am propus să urmărim dacă QC poate să inducă eliberarea de calciu în celulele Jurkat și să stabilim efectul pe care aceasta îl are la nivelul substratului lanțului respirator, nicotinamid adenin dinucleotida NAD(P)H. Rezultatele noastre sunt consistente cu ideea că încărcarea citosolică cu Ca^{2+} și hiperoxidarea NAD(P)H sunt implicate în inducerea apoptozei de către quercetină.

Metoda de lucru pentru măsurătorile de Ca^{2+} a fost descrisă în detaliu în raportul științific al proiectului din anul 2009. Pe scurt, 5×10^6 celule au fost spălate de 2 ori cu soluție salină SS (conținând 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glucoză, pH 7.2/NaOH), incubate cu indicatorul fluorescent fura-FF (5 μM , 30 min. la temperatura camerei) în soluție salină SS, după care au fost spălate de 2 ori în SS și resuspendate în 2 ml SS la o concentrație de 10^6 celule/ml. Proba celulară a fost plasată în cuveta de quartz și intensitatea fluorescenței a fost măsurată cu un spectrofluorimetru Horiba Jobin-Yvon, cu emisie la 510 nm și excitație dublă, la 340 nm și respectiv 380 nm, la intervale de timp de 17 s. Constanta de disociere a fluoroforului fura-FF a fost considerată 5.5 μM (conform producătorului, Invitrogen). Calibrarea semnalului s-a făcut prin permeabilizarea celulelor cu 80 μM timp de 15-20 min., urmată de adăugare de EGTA până la o concentrație finală de 10 mM.

În urma măsurătorilor de fluorescență a celulelor încărcate cu fura-2/AM, am determinat că 50 μM QC au indus o eliberare consistentă de calciu din rezervoarele intracelulare, generând astfel un semnal bifazic distinct de Ca^{2+} (Fig. 1). Faza inițială de creștere a fost rapidă, cu un maximum la 1.67 μM care a fost atins la 1.2 min. după adăugarea quercetinei la suspensia celulară. Faza de descreștere a semnalului de Ca^{2+} a putut fi cel mai bine fitată cu o ecuație dublu exponențială având constantele de timp corespunzătoare de 0.484 ± 0.086 min. și 4.54 ± 0.17 min., respectiv. Nivelul staționar final obținut din fit a fost 425.7 ± 2.8 nM, consistent mai mare decât concentrația de repaus inițială, 196.4 ± 29.9 nM (valoare similară cu cea din raportări anterioare [1,2]).

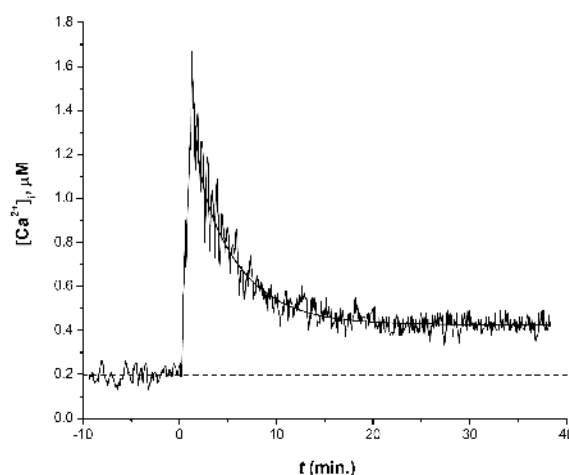


Fig. 1 - 50 μM quercetină induce o creștere tranzitorie a nivelului de Ca^{2+} intracelular în celulele Jurkat. Semnalul de calciu a fost înregistrat prin spectrofluorimetrie în celulele încărcate cu fura-2/AM, și curba a fost obținută prin medierea datelor a 5 experimente diferite. Faza de declin a semnalului a fost fitată cu o ecuație dublu exponențială (linia continuă netedă) folosind programul Origin. Nivelul de repaus obținut prin mediere pentru perioada inițială este indicat de linia întreruptă. QC s-a adăugat la $t = 0$.

În plus, am descris proprietățile fluorescente ale QC intracelulare în sistemul celular Jurkat. Pentru a caracteriza mai bine proprietățile fluorescente ale quercetinei intracelulare, am monitorizat

modificările spectrelor de fluorescență ale acestora în urma expunerii celulelor Jurkat intacte la 50 μM QC, după permeabilizarea celulei cu digitonină, care a dus la ridicarea nivelului citosolic de Ca^{2+} la 1 mM și după adăugarea de EGTA în urma căreia concentrația de Ca^{2+} s-a redus la 15 nM.

S-a observat apariția unui maxim proeminent centrat la 546 nm, intensitatea fluorescenței la această lungime de undă crescând progresiv în urma expunerii continue la QC. După adăugarea digitoninei în cuvă, spectrul de emisie al QC s-a lărgit, însă a rămas centrat pe cca. 540 nm. În continuare, după reducerea concentrației Ca^{2+} la 15 nM prin adăugarea EGTA, spectrul de emisie al QC a rămas calitativ similar celui obținut la 1 mM Ca^{2+} , dar a suferit o creștere a intensității (detalii în raportul *in extenso* și în [8]).

Am determinat, de asemenea, spectrele de excitare ale QC intracelulare, în aceleași condiții cu cele descrise mai sus, cu emisia la 527 nm și respectiv la 544 nm. În celule intacte, s-au evidențiat două maxime specifice la 380 nm respectiv la 440 nm. Amplitudinea ambelor maxime a crescut în mod continuu în urma expunerii la QC. După permeabilizarea în soluția cu 1 mM Ca^{2+} ambele maxime au prezentat o creștere continuă peste valorile observate în celulele intacte, dar au prezentat răspunsuri diferite la reducerea nivelului de Ca^{2+} la 15 nM. Aceste date indică faptul că există două stări moleculare diferite de quercetină legată intracelular care sunt sensibile la Ca^{2+} . Fluorescența pentru starea corespunzătoare lungimii de undă de 380 nm a crescut în timp ce aceea corespunzătoare lungimii de undă 440 nm a scăzut atunci când concentrația Ca^{2+} s-a redus de la 1 mM la 15 nM (detalii în raportul *in extenso* și în [8]).

Spectrele de emisie ale celulelor control obținute cu excitare la 440 nm (Fig. 2A), respectiv 380 nm (Fig. 2B) prezintă trăsăturile caracteristice ale NAD(P)H [3,4] cu un spectru relativ larg. Emisia fluorescentă, în ambele cazuri, a crescut după expunerea la quercetină timp de 15 min., iar spectrele de diferență prezintă un maximum distinct la 536 nm, respectiv 545 nm. În cazul excitării cu 380 nm spectrul de diferență prezintă o reducere marcată a fluorescenței în domeniul $\lambda < 500$ nm ceea ce permite să se conchidă că adăugarea de quercetină duce la scăderea nivelului de NAD(P)H (Fig. 2B) (detalii în raportul *in extenso* și în [8]).

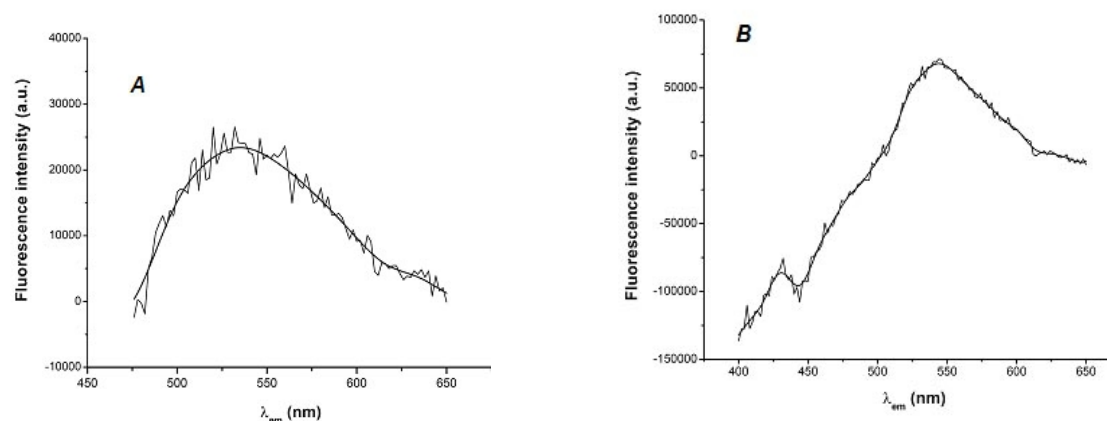


Fig. 4 – Spectrele de diferență în cazul emisie de fluorescență al quercetinei intracelulare în urma excitării cu 440 nm. (A), sau cu 380 nm (B). Datele au fost netezite cu un algoritm 8-point FFT Origin (linia netedă).

Colectiv, toate aceste rezultate indică clar faptul că maximele observate în spectrele de diferență prezentate corespund quercetinei legate intracelular în celulele sistemului Jurkat.

Acest studiu indică clar faptul că QC se acumulează în interiorul celulelor Jurkat și se leagă de proteine intracelulare, prezentând o fluorescență specifică cu emisia la ~ 540 nm. În condițiile noastre experimentale, quercetina intracelulară a prezentat două maxime specifice de excitație, la ~ 380 nm și la ~ 440 nm, care ar putea corespunde la două proteine diferite care leagă quercetina, sau, alternativ, la două stări diferite ale unei unice proteine ce leagă quercetina. Mai mult, am găsit că ambele stări sunt sensibile la nivelul intracelular de Ca^{2+} și prezintă efecte diferite la reducerea concentrației de $[\text{Ca}^{2+}]$; de la valori foarte ridicate (1 mM) la valori foarte scăzute (15 nM). Am arătat, de asemenea, că 50 μM quercetină induce un semnal de eliberare de Ca^{2+} în celulele Jurkat, ridicând rapid nivelul

de Ca^{2+} citosolic de la 196 nM la 1.7 μM . Declinul $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a evoluat lent, pe o scară de timp de ordinul a ~ 10 min., și în final a atins un nivel staționar de 426 nM, consistent mai ridicat decât valoarea de repaus a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Aceste rezultate sugerează faptul că QC promovează mobilizarea Ca^{2+} din depozitele intracelulare, posibil acționând ca un activator al canalului de eliberare a Ca^{2+} [5,6].

O parte a rezultatelor obținute a fost publicată într-o revistă cotate ISI [8].

Bibliografie

1. I. Baran, C. Ganea, A. Scordino, F. Musumeci, V. Barresi, S. Tudisco, S. Privitera, R. Grasso, D.F. Condorelli, I. Ursu, V. Baran, E. Katona, M.M. Mocanu, M. Gulino, R. Ungureanu, M. Surcel, C. Ursaciuc, *Cell Biochem. Biophys.* **58**, 169 – 179 (2010)
2. T. Nordström, T. Mustelin, T. Pessa-Morikawa, L.C. Andersson, *Biochem. J.* **283**, 113 – 118 (1992)
3. S. Sakano, H. Takemura, K. Yamada, K. Imoto, M. Kaneko, H. Ohshika, *J. Biol. Chem.* **271**, 11148 – 11155 (1996)
4. L.D. Gaspers, A.P. Thomas, *Methods* **46**, 224 – 232 (2008)
5. J. Eng, R.M. Lynch, R.S. Balaban, *Biophys. J.* **55**, 621 – 630 (1989)
6. E.H. Lee, G. Meissner, D.H. Kim, *Biophys. J.* **82**:1266–1277 (2002)
7. I. Baran, C. Ganea, V. Baran, *Eur. Biophys. J.* **37**, 793 – 806 (2008)
8. Baran, I, C. Ganea I. Ursu, V. Baran, O Calinescu, A. Iftime, R. Ungureanu, I.T. Tofolean, *Rom. J. of Physics* Volume 56, no. 3-4, 388-398, 2011

Studiul efectelor unor flavonoizi asupra relației între luminescența întârziată și proliferare/viabilitate/ apoptoză în condiții de stress oxidativ

Având în vedere interesul crescând pentru utilizarea spectroscopiei de luminescență întârziată (DL) în aplicații clinice [1-3], un alt scop al studiilor noastre a fost acela de a contribui la elucidarea mecanismelor responsabile de luminescența întârziată a celulelor vii, ca și acela de a furniza date noi privind relația DL și starea celulei. Luminescența întârziată reprezintă o emisie de lumină foarte slabă, pe o scară de timp largă, în urma expunerii la lumină pulsată sau radiația UV. Am investigat proprietățile DL în celulele de leucemie umană Jurkat în urma condițiilor de stress oxidativ și iradiere. Cuantificarea acestor aspecte poate ajuta la găsirea răspunsurilor privind originea DL, problemă care este în momentul de față în dezbateră.

Măsurătorile de luminescență întârziată s-au efectuat la LNS-INFN Catania, Italia. Pentru a măsura luminescența întârziată a culturilor celulare a fost utilizat sistemul de mare sensibilitate ARETUSA “Advanced Research Equipment for fasT Ultraweak luminescence Analysis” [3]. Cu acest sistem se pot detecta fotoni singulari și, în plus, nivelul zgomotului este foarte redus. De asemenea, eficiența colectării luminii emise de culturile celulare este foarte bună, iar înregistrarea semnalului începe cu o întârziere mică față de sfârșitul pulsului de iluminare. Ca sursă de lumină este folosită o sursă laser pe bază de azot (Laser Photonics LN 230C), având lungimea de undă de 337 nm, și o lărgime a pulsului de 5 ns, cu o energie de $100 \pm 5 \mu\text{J/puls}$. Detaliile se găsesc în raportul pe anul 2010.

Studiile noastre anterioare au indicat faptul că DL este corelată cu activitatea Complexului I al lanțului respirator mitocondrial (MRC) dar nu cu existența rupturilor lanțului ADN [2,4]. Am găsit anterior că menadiona (MD), quercetina (QC) și H_2O_2 acționează ca inhibitori ai DL [2]. Deoarece atât MD cât și QC inhibă respirația mitocondrială la nivelul Complexului I, am investigat mecanismele prin care acești compuși au asupra DL un efect opus celui al rotenonului. În acest scop am măsurat variațiile NADH intracelular și superoxidului mitocondrial după expunerea la diferite doze de ROT. Așa cum era de așteptat ambele niveluri au crescut consistent (până la de ~ 8 ori). În schimb QC a scăzut substanțial (de ~ 3 -5 ori) atât nivelul de NADH cât și pe cel de superoxid, probabil exercitând un efect antioxidant care a împiedicat acumularea acestor specii.

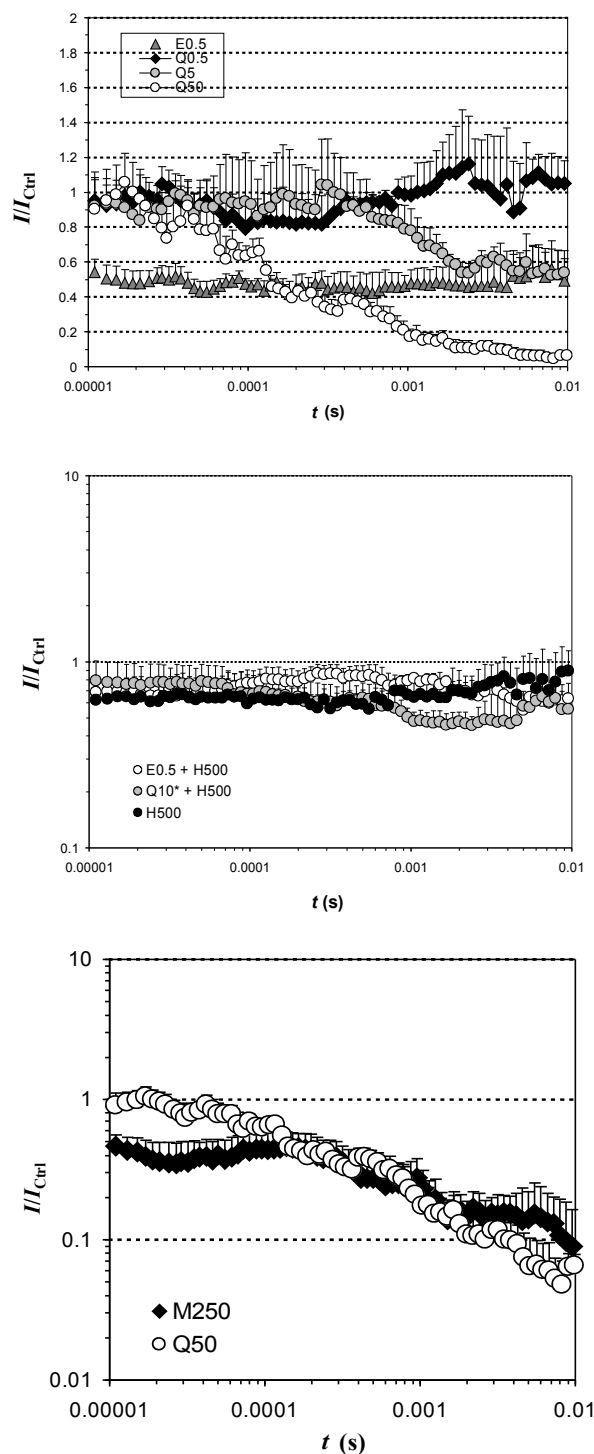


Fig. 1: Cinetica emisiei DL a celulelor Jurkat după diferite tratamente marcate ca în Fig. 1. Intensitatea emisiei luminoase (I) este normalizată la intensitatea DL a culturilor netratate (I_{crit}).

Aceste măsurători au indicat pentru prima dată corelația foarte puternică între randamentul cuantic al DL și nivelul de NADH și de superoxid mitocondrial.

Toate aceste date sprijină puternic ideea conform căreia Complexul I al lanțului respirator mitocondrial este o sursă importantă de luminescență întârziată în celulele vii și sugerează faptul că DL este corelată cantitativ atât cu nivelul de NADH cât și cu cel de superoxid mitocondrial. În plus, măsurătorile noastre indică faptul că recombinarea de sarcini în centrul N2 al Complexului I produce luminescență întârziată cu o lungime de undă caracteristică de 686 nm și o constantă de timp de scădere de 132 μ s.

Am reluat și completat o serie de experimente efectuate într-o fază anterioară privind efectele QC asupra DL. În plus, am studiat efectele flavonoidului EGCG asupra DL și am comparat aceste efecte cu acelea ale QC și menadionei. La doze crescătoare, quercetina a inhibat progresiv DL (Fig. 1). Cea mai sensibilă regiune a DL a fost DL-III, care a scăzut cu un ordin de mărime după tratamentul cu 50 μM QC timp de 24 h, în timp ce DL-I a fost doar ușor afectată de QC. QC și MD la doze mari au prezentat efecte virtual identice asupra DL pe un interval de timp întins, de la 100 μs la 10 ms după excitarea cu laser (Fig. 1), consistent cu ideea că efectele lor similare asupra DL au fost produse de producerea de superoxid și inhibarea Complexului I al lanțului respirator mitocondrial [2]. EGCG a exercitat un efect calitativ diferit asupra DL, cu o reducere destul de uniformă a intensității fotoemisiei pe întreaga scară de timp. H₂O₂ a redus semnificativ DL în regiunile DL-I și DL-II (Fig. 4). Pre-tratamentul cu 10 μM EGCG timp de 24 h a putut să inducă o revenire semnificativă a emisiei DL-II, în timp ce 10 μM QC timp de 1 h a redus și mai mult intensitatea DL-III a celulelor expuse la H₂O₂ (detalii în raportul *in extenso*).

Rezultatele au fost acceptate spre publicare în 2 reviste din străinătate cotate BDI [5,6].

Bibliografie

1. Swartz TE et al. 2001. *J Biol Chem.* 276: 36493-36500
2. I. Baran, C. Ganea, A. Scordino, F. Musumeci, V. Barresi, S. Tudisco, S. Privitera, R. Grasso, D.F. Condorelli, I. Ursu, V. Baran, E. Katona, M.M. Mocanu, M. Gulino, R. Ungureanu, M. Surcel, C. Ursaciuc, *Cell Biochem. Biophys.* **58**, 169 – 179 (2010)
3. Tudisco S, Scordino A, Privitera G, Baran I, Musumeci F. 2004. *Nucl Instr Meth Phys Res A* 518: 463-464
4. Baran I, Ganea C et al. 2009. *Rom J Phys* 54: 557-569
5. Baran, I., C. Ganea, et al., *Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud*, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561
6. Baran, I., C. Ganea, et al., *Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud*, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561

Diseminarea rezultatelor

Publicații ISI

1. Baran, I; Ganea, C; Ungureanu, R, I.T. Tofolean, Signal mass and Ca²⁺ kinetics in local calcium events: a modelling study, *Journal of Molecular Modeling*, 2011, acceptat, DOI: 10.1007/s00894-011-1104-6, if 1.871
2. Baran, I, C. Ganea I. Ursu, V. Baran, O Calinescu, A. Iftime, R. Ungureanu, I.T. Tofolean, Fluorescence properties of quercetin in human leukemia Jurkat_T cells, *Rom. J. of Physics* Volume 56, no. 3-4, 388-398, 2011, if. 0.340
3. Ionescu, D., Ganea, C., A study of quercetin effects on phospholipid membranes containing cholesterol using Laurdan fluorescence, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2011, trimis, în revizie, if 3.101

Publicații BDI

1. Popescu, A., A. Iftime, C. Ganea, Possible protective effect of quercetin against heavy metals insertion in lipid bilayers, *Rom. J. Biophys.* (Index Copernicus) 2011 21(3):167-178
2. Baran, I., C. Ganea, et al., Apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat-T cells after proton-irradiation and treatment with oxidants agents and flavonoids, **Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud**, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561
3. Baran, I., C. Ganea, et al., Effects of the mitochondrial respiration inhibitor, rotenone, on apoptosis, clonogenic survival and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells, **Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud**, acceptat; Edit. Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia; ISSN: 1827-1561