

Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie – decembrie 2012

Analiza detaliată a apoptozei și a luminescenței întârziate în celulele leucemice umane Jurkat T în urma iradierii cu protoni și a tratamentelor cu agenți oxidanți și flavonoide

Introducere. Așa cum am arătat deja în prima fază a proiectului, epigallocatechina-3-galată (EGCG) și quercetina (QC; 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone) sunt două flavonoide bine investigate care inhibă proliferarea celulară și induc apoptoza în diferite tipuri de cancer [1-6]. În continuarea unor cercetări anterioare referitoare la acțiunea acestor doi compuși asupra celulelor leucemice umane Jurkat-T [7], am investigat mai amănunțit relația dintre apoptoză și luminescența întârziată (DL) în acest tip de celule, în urma tratamentelor cu diferite substanțe. Am utilizat menadiona (MD) și peroxidul de hidrogen (H_2O_2 - apa oxigenată) pentru a induce stresul oxidativ și cele două flavonoide, QC și EGCG, aplicate singure sau în combinație cu MD sau H_2O_2 . Întrucât în terapia diferitelor tipuri de cancer se utilizează adesea tratamente combinate, medicamente-radiații, am utilizat fascicule de protoni de 62 MeV pentru a iradia celulele cu doze uniforme de 2 ori 10 Gy, respectiv. Am evaluat apoptoza, distribuțiile în ciclul celular și luminescența întârziată. Am arătat că MD, H_2O_2 și QC au fost inductori potenți ai apoptozei și inhibitori ai DL. Quercetina a scăzut supraviețuirea celulară și nivelul de NAD(P)H într-o manieră dependentă de doză. Iradierea cu protoni cu 2 Gy dar nu și cu 10 Gy a crescut rata apoptotică. Totuși, ambele doze au indus o oprire substanțială a fazei G_2/M . Quercetina a redus apoptoza și a prelungit oprirea G_2/M indusă de radiație. Spectroscopia DL a indicat faptul că iradierea cu protoni a dus la întreruperea fluxului de electroni în Complexul I al lanțului respirator mitocondrial, explicând astfel necroza masivă indusă de către doza de 10 Gy de protoni și, de asemenea, a sugerat o acțiune echivalentă a menadionei și quercetinei la nivelul centrului $N_2 Fe/S$, care ar putea fi mediată de legarea lor la un site comun în Complexul I, probabil locul de legare a rotenonului.

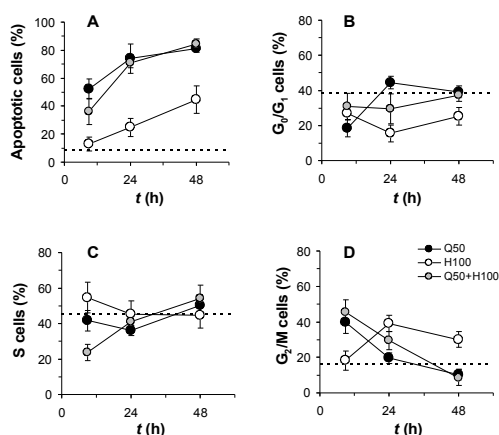
Materiale și metode. Metoda de lucru a fost descrisă în detaliu în raportul științific *in extenso* al proiectului, ca și în publicația rezultată în urma studiului de față [8]. Pe scurt, am efectuat măsurători de viabilitate celulară prin colorare cu albastru tripan, iar apoptoza și ciclul celular au 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 $\mu g/ml$ streptomycină. **Condiții de iradiere.** Suspensiile celulare (7 ml) au fost iradiate în tuburi de centrifugă de 50 ml în poziție verticală. Fasciculele de protoni de uz clinic de 62 MeV accelerate în ciclotronul supraconductor de la LNS-INFN, Catania (Italia) au fost utilizate la o rată a dozei de 11.76 Gy/min. Ca dozimetru de referință a fost adoptată o cameră de ionizare PTW 34045 Markus. **Spectroscopia de luminescență întârziată.** Am utilizat o variantă îmbunătățită a sistemului ARETUSA [9], un echipament de mare sensibilitate capabil să detecteze fotoni singulari. Probele celulare au fost excitate cu un laser pe bază de azot (Laser Photonics LN 230C; lungime de undă 337 nm, lărgime a pulsului de 5 ns, energie $100 \pm 5 \mu J/puls$). Pentru detecția fotoemisie s-a utilizat un tub fotomultiplicator multi-alkalin (Hamamatsu R-7602-1/Q) pentru semnale cu lungimi de undă în domeniul vizibil (VIS, 400-800 nm), în mod de numărare a fotonilor singulari. **Spectrofluorimetrie.** Pentru a determina nivelul intracelular relativ de nicotinamid adenin nucleotid și nicotinamid adenin nucleotid fosfat în forma lor redusă (NADH și NADPH, respectiv), notate generic cu NAD(P)H, celulele cu creștere exponențială au fost spălate de două ori într-o soluție salină standard (SS) conținând 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES, 10 mM glucoză, pH 7.2/NaOH, resuspendate în SS la $\sim 10^6$ celule/ml și transferate într-o cuvă de cuarț de 2 ml menținută la 37°C sub agitare continuă într-un spectrofluorimetru Horiba Jobin Yvon. La fiecare 22 s proba celulară a fost excitată la 340 nm și emisia a fost colectată la 450 nm. După stabilizarea semnalului de fluorescență, s-a adăugat direct în cuvă QC la doza indicată și s-a realizat înregistrarea cineticii timp de 45-60 minute. Toate măsurătorile spectrofluorimetrice au fost efectuate la 37°C. **Statistica.** Dacă nu se indică altfel, datele sunt prezentate ca media \pm e.m.s. pentru cel puțin trei măsurători diferite. Diferențele semnificative statistic au fost determinate utilizând testul *t* - Student. S-a considerat semnificativ un nivel $P < 0.05$ în toate testele statistice. Alte detalii în [8].

Rezultate și discuții.

Efectele iradierii cu protoni, ale MD, H₂O₂, QC și EGCG asupra apoptozei și ciclului celular

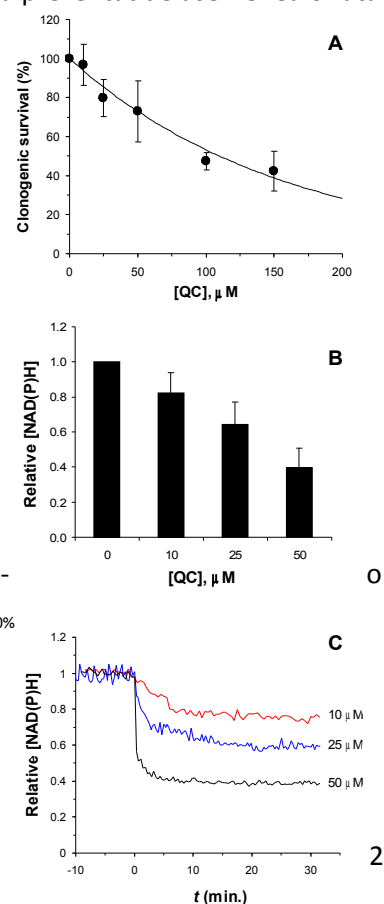
Am reluat măsurătorile începute anterior efectuând o analiză mai detaliată și am evaluat mai întâi apoptoza și distribuțiile ciclului celular în celulele Jurkat în urma diferitelor tratamente. În concordanță cu investigațiile noastre anterioare [7, 10], quercetina a indus apoptoza în celulele Jurkat într-o manieră dependentă de doză și durată, iar 0.5 μM EGCG care s-au aplicat timp de 24 h nu au afectat rata apoptotică sau distribuția ciclului celular, dar au amplificat apoptoza indusă de MD ori H₂O₂. Consistent cu studiile deja menționate, în studiul de față am găsit că iradierea cu protoni de energie înaltă de 2 Gy dar nu și de 10 Gy a produs o creștere semnificativă în rata apoptotică la 48 de ore după iradiere. Testul de excludere cu albastru tripan a confirmat ratele înalte de moarte celulară, și anume $18.4 \pm 3.2\%$ și $46.6 \pm 6.8\%$ la 24 h și, respectiv, 48 h după iradierea cu 10 Gy protoni.

Fig. 1. Evoluția în timp a ratei apoptotice și a distribuției ciclului celular după tratamentul celulelor Jurkat cu 50 μM QC timp de 24 h (Q50, cercuri solide), 100 μM H₂O₂ timp de 20 min. (H100, cercuri deschise) sau cu o combinație a celor două (50 μM QC pre-incubare urmată de adăugarea a 100 μM H₂O₂ timp de 20 min.; tratamentul notat cu Q50 + H100, cercurile gri). Sunt indicate ratele apoptotice pentru fracțiile celulare (A), G₀/G₁ (B), faza S (C) și G₂/M (D). Linia punctată reprezintă media obținută pentru probele celulare control.



Din măsurătorile cinetice se observă că quercetina poate opri celulele Jurkat în faza G₂/M (Fig. 1). Mai mult, fracția celulară G₂/M în cazul celulelor tratate cu 50 μM QC timp de 24 h a descrescut de la $39.8 \pm 6.4\%$ la 9 h, la $10.3 \pm 3.0\%$ la 48 h după tratament (Fig. 1D). Blocarea G₂/M a fost asociată cu o reducere semnificativă a fracției celulare G₀/G₁ (Fig. 1B), în timp ce distribuția fazei S a rămas nemodificată (Fig. 1C). Celulele au prezentat de asemenea o rată apoptotică consistentă ($52.2 \pm 7.3\%$) la 9 h după îndepărtarea compusului, care a crescut apoi gradat până la 81.5% în timpul intervalului de măsurare (Fig. 1A).

Fig. 2. Quercetina descrește supraviețuirea clonogenă și conținutul celular de NAD(P)H în celulele Jurkat. (A) Răspunsul doză-răspuns al clonogenității (S) a fost fitat cu o funcție exponențială de forma $S(\%) = 100 \times \exp(-D/D_0)$, unde D reprezintă doza de QC aplicată timp de 1 h și doza caracteristică derivată din fit a fost $D_0 = 158.5 \mu\text{M}$. Datele sunt exprimate ca media \pm deviația standard a 4 - 6 determinări separate. (B) Raportul dintre fluorescența NAD(P)H a celulelor tratate vs. celulele control (NAD(P)H relativ) obținută în starea staționară după adăugarea de QC suspensiei celulare a descrescut odată cu nivelul de QC. (C) Înregistrări reprezentative ale fluorescenței NAD(P)H relativ la valoarea de repaus în suspensii celulare înainte și după adăugarea QC la nivelurile indicate în fiecare traseu.



În tratamentele cu durată de 1 h, QC a descrescut supraviețuirea celulară într-un mod exponențial, cu o doză estimată de reducere a clonogenității la 50%, $D_{50\%} = 109.8 \mu\text{M}$ (Fig. 2A). În experimente separate de spectrofluorimetrie, QC a descrescut, de asemenea, conținutul celular de NAD(P)H într-o manieră dependentă de doză, cu o doză efectivă pentru efectul la 50%, $IC_{50} = 39.5 \mu\text{M}$ (Fig. 2B). În Fig. 3C sunt prezentate câteva exemple de înregistrări de fluorescență a NAD(P)H în

suspensiile de celule Jurkat expuse la diferite concentrații de QC. După adăugarea QC, semnalul de fluorescență a NAD(P)H a scăzut lent (în până la ~15 min.) la o valoare staționară care a apărut a fi dependentă de doză. Fig. 3B sumarizează starea staționară obținută din înregistrările de tipul celor din Fig. 2C. Într-un alt set de experimente, am investigat efectele pre-incubării celulelor Jurkat cu 50 μM QC timp de 1 h asupra apoptozei și a distribuției ciclului celular în urma iradierii cu 2 Gy protoni (Fig. 3). Quercetina a exercitat un efect inhibitor asupra apoptozei (Fig. 3A) și a părut a prelungi semnificativ oprirea G_2/M indusă de către iradierea cu protoni (Fig. 3D), fapt ce ar putea indica o capacitate crescută de reparare a ADN și de menținere activă a punctului de control din G_2/M . Reducerea paralelă a conținutului celular al fracției S (Fig. 3C) și conservarea fracției G_0/G_1 (Fig. 3B) sugerează că celulele care supraviețuiesc iradierii ar putea suferi o oprire adițională a fazei G_0/G_1 dar nu și a fazei S la 48 h după iradiere.

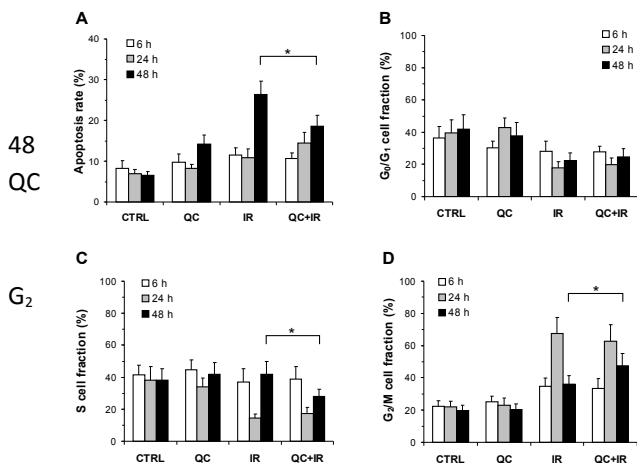


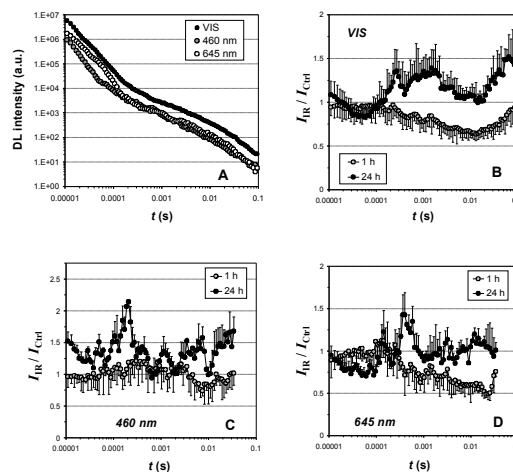
Fig. 3. Apoptoza și distribuțiile ciclului celular evaluate la 6, 24 și h după tratamentul celulelor Jurkat cu vehiculul (Ctrl), cu 50 μM timp de 1 h (QC), cu 2 Gy de radiație de protoni (IR) sau cu 2 Gy radiație de protoni după preincubarea cu 50 μM QC timp de 1 h (QC + IR). (A) ratele apoptotice, (B) G_0/G_1 , (C) faza S și (D) fracția /M. Cu steluță sunt notate diferențele semnificative dintre tratamentele cu IR și QC + IR.

asupra luminescenței întârziate

DL a celulelor Jurkat iradiate cu 10 Gy protoni de energie înaltă a prezentat caracteristici diferite când a fost măsurată la 1 h ori la 24 h după iradiere. Prin urmare, s-a observat o reducere de $34.1 \pm 9.6\%$ a randamentului cuantic relativ al DL-III în VIS la 1 h de la iradiere, în timp ce probele celulare măsurate la 24 h după iradiere au prezentat o creștere a randamentului cuantic relativ de $27.3 \pm 8.5\%$ al DL-II și o creștere de $41.8 \pm 14.3\%$ în domeniul de timp 10 - 100 ms, pe când celelalte componente ale emisiei DL în VIS nu au prezentat diferențe semnificative în raport cu emisia DL în repaus (Fig. 4B).

Fig. 4. Cinetica emisiei DL a celulelor Jurkat în condiții control (A) ori după iradierea cu 10 Gy protoni (B-D). În (A) se arată câteva curbe reprezentative de fotoemisie pentru întregul domeniu vizibil (VIS), ca și pentru detecția luminii cu 460 nm și 645 nm emisă de către același eșantion de celule. În (B-D) intensitatea emisiei de lumină a celulelor iradiate (I_{IR}) este normalizată la intensitatea DL a culturilor ne-iradiate (I_{Ctrl}). Măsurătorile au fost efectuate la 1 h și 24 h de la iradiere, așa cum se indică în figură. Rezultatele sunt prezentate pentru lumina emisă în VIS (B), 460 nm (C) și 645 nm (D).

La scurt timp după iradiere, DL emisă la 460 nm a fost similară cu cea a celulelor control; totuși, celulele supraviețuitoare au prezentat la 24 h mai târziu o amplificare totală a DL de cca. 35% din intensitatea control (Fig. 4C). A fost detectată o creștere remarcabilă, până la de 1.7 ori, a emisiei în albastru, pentru o componentă a DL cu o constantă de timp de 178 μs (valoarea derivată din analiza de fitare nu este arătată, totuși un vârf distinct centrat pe cca. 180 μs este clar vizibil în Fig. 4C). La 1 h după iradiere, emisia întârziată a luminii roșii a prezentat o reducere semnificativă a componentei DL-III, cu $38.3 \pm 11.5\%$, în timp ce 24 h mai târziu DL-I a scăzut la $76.1 \pm 13.8\%$ din emisia control și a apărut o creștere semnificativă a componentei DL cu o constantă de timp estimată la 379 μs (Fig. 4D, și alte date ale analizei).



Efectele iradierii cu protoni, ale MD, H_2O_2 , QC și EGCG

La doze crescătoare, quercetina a inhibat progresiv DL (Fig. 5A). Cea mai sensibilă regiune a DL a fost DL-III, descrescând 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. EGCG a exercitat un efect calitativ diferit asupra DL producând o reducere destul de uniformă a intensității fotoemisie pe întreaga scară de timp.

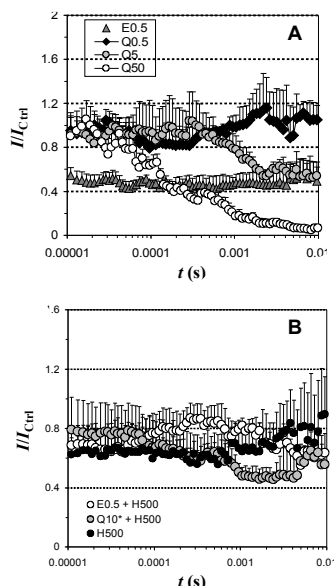


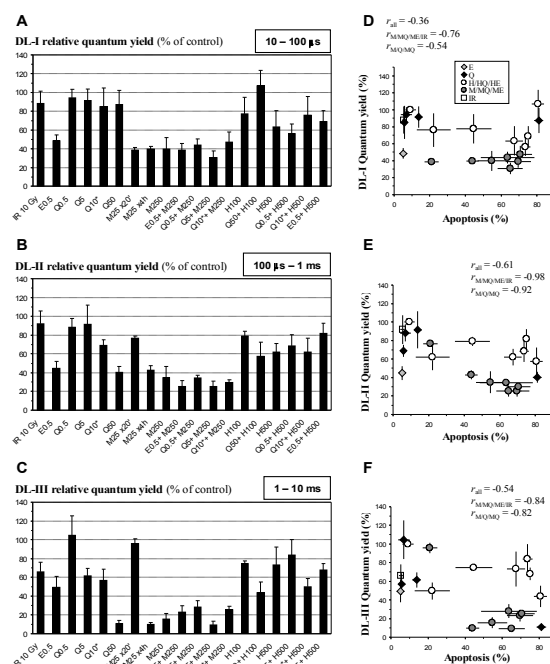
Fig. 5. Cinetica emisiei DL a celulelor Jurkat după diferite tratamente cu flavonoide (A) ori cu H_2O_2 singur, ori în combinație cu EGCG ori QC (B). Tratamentele sunt marcate în figură. Intensitatea emisiei de lumină a celulelor tratate (I) este normalizată la intensitatea DL a celulelor control (I_{crit}) [7].

500 μM H_2O_2 aplicați timp de 20 min. au redus semnificativ DL în regiunile DL-I și DL-II (Fig. 5B, Fig. 6A, B). Pre-tratamentul cu 0.5 μM EGCG timp de 24 h a fost capabil să inducă o revenire semnificativă a emisiei DL-II, în timp ce preincubarea cu 10 μM QC timp de 1 h a redus încă mai mult intensitatea DL-III. O doză mai scăzută, de 100 μM H_2O_2 , a avut un efect modest asupra DL și a inhibat fotoemisii cu $\approx 22\%$ pe întreaga scară de timp (Fig. 6A-C). Preincubarea cu 50 μM QC timp de 24 h a restaurat emisii DL-I, dar a inhibat substanțial DL-II și DL-III. Menadiona a inhibat, de asemenea, DL într-o manieră dependentă de doză, și spre deosebire de efectul modest al QC asupra DL-I, MD a redus substanțial fotoemisii în regiunea DL-I (Fig. 6A).

Fig. 6. Produsul cuantic al DL relativ la control (A-C) și corelația acestuia cu fracția celulară apoptotică (D-F) la diferite tratamente așa cum sunt indicate în figură. Q, E, M/MQ/ME, H/HQ/HE și IR reprezintă tratamente cu QC- ori EGCG, tratamente cu MD cu sau fără preincubare cu QC-ori EGCG, tratamente cu H_2O_2 cu sau fără preincubare cu QC- ori EGCG, și iradiere cu 10 Gy protoni, respectiv. Se indică și coeficienții de corelație Pearson pentru toate tratamentele (r_{all}), pentru tratamentele M/MQ/ME/IR ($r_{\text{M/MQ/ME/IR}}$) și pentru tratamentele M/Q/MQ ($r_{\text{M/Q/MQ}}$). Rezultatele obținute pentru domeniile de timp DL separate DL indicate în căsuțele interioare sunt prezentate individual pentru DL-I (A, D), DL-II (B, E) și DL-III (C, F).

Această inhibiție a fost puternică chiar și la cea mai scăzută doză, 25 μM , de menadionă. DL-II a fost inhibată într-o măsură similară de către doze mari de MD (Fig. 6B), în timp ce DL-III a prezentat o reducere drastică, astfel, în tratamentul cu M250, randamentul cuantic al DL-III a ajuns la $15.5 \pm 6.1\%$ din valoarea sa de repaus (Fig. 6C). Preincubarea cu cele două flavonoide a indus, în general, o revenire parțială a DL-III până la 25% din valoarea de repaus, exceptând cazul pre-tratamentului cu 5 μM QC timp de 24 h, când s-a înregistrat o reducere suplimentară de $9.2 \pm 3.8\%$.

Pentru moment, efectele QC sau ale EGCG asupra apoptozei induse în celulele Jurkat de către flavonoide însele sau în conjuncție cu menadiona și peroxidul de hidrogen sunt puțin cunoscute. Noi am găsit aici că un tratament de 24 de ore cu niveluri fiziologice de QC și EGCG (0.5 - 5 μM) pot să potențeze activitatea antiproliferativă a menadionei prin amplificarea apoptozei induse de acești compuși în celulele Jurkat T de leucemie umană. În acord cu rapoartări anterioare privind faptul că QC este un inhibitor mai potent al formării radicalilor hidroxil decât un scavenger al anionilor superoxid [11], nici unul dintre tratamentele bazate pe quercetină utilizate în



lucrarea prezentă nu a exercitat un efect protector față de MD, în timp ce o incubare scurtă cu 10 μM QC timp de 1 h a oferit o protecție consistentă față de H_2O_2 și a indus oprirea ciclului celular G_2/M , permițând astfel un timp pentru repararea leziunii induse de H_2O_2 . Cu toate acestea, deși administrarea pe termen lung a QC sau EGCG ar putea îmbunătăți semnificativ tratamentul leucemiei bazat pe menadionă, este important să se stabilească nivelul critic de flavonoid care nu mai este benefic pentru celulele normale. Investigațiile noastre sugerează o legătură între abilitatea quercetinei de a descrește nivelul de NAD(P)H și inducția apoptozei, care este mediată, probabil, de eșecul în a menține gradientul electrochimic ATP-dependent de-o parte și de alta a membranei mitocondriale interne și disiparea consecutivă a potențialului membranar mitocondrial. Similar cu efectul protector al QC față de H_2O_2 discutat mai sus, rezultatele noastre sugerează că tratamente scurte cu quercetină ar putea îmbunătăți supraviețuirea celulară după iradiere cu protoni, cel mai probabil prin inhibarea formării de radicali hidroxil după iradiere și prin protecția față de lezarea celulară oxidativă a ADN. Datele prezentate aici indică faptul că DL a celulelor iradiate măsurată imediat după iradiere a fost dominată de emisia în regiunea roșie a spectrului și a fost caracterizată printr-o reducere semnificativă în regiunea din domeniul milisecundelor DL-III. Din contra, emisia DL a celulelor iradiate care au supraviețuit în următoarele 24 h a fost dominată de emisia luminii în regiunea albastră a spectrului și a prezentat o creștere considerabilă în regiunea de sub-milisecunde DL-II. Mai mult, celulele care au supraviețuit la 1 zi după iradiere au prezentat două stări DL distincte și anume o stare cu emisia în albastru cu un timp de viață caracteristic de 178 μs , și o stare cu emisia în roșu cu un timp de viață caracteristic de 379 μs . În acord cu rezultatele noastre anterioare [7] și cu o serie de date pe care le-am obținut cu celulele tratate cu rotenon, ca și cu ratele bine stabilite de transfer de electroni în Complexul I [12], propunem ipoteza privind faptul că starea cu emisie în roșu este caracteristică centrului Fe/S N2 în formă redusă. Având în vedere interesul crescând al utilizării spectroscopiei DL în aplicații clinice [13-16], rezultatele noastre aduc un sprijin suplimentar în dezvoltarea acestei metodologii ca o unealtă valoroasă de investigație și diagnostic. Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista *ISI Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, cu factor de impact 2.8 [8].

Diseminare:

1. Baran, Irina; Ganea, Constanta; et al., Detailed Analysis of Apoptosis and Delayed Luminescence of Human Leukemia Jurkat T Cells after Proton Irradiation and Treatments with Oxidant Agents and Flavonoids, **OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY**, Article Number: 498914, DOI: 10.1155/2012/498914 Published: 2012
2. Baran, I.; Katona, E.; Ganea, C., Quercetin fluorescence reveals the open probability of the RyR3 Ca^{2+} channel in intact cells, 22nd IUBMB Congress/37th FEBS, Seville, SPAIN, SEP 04-09, 2012, FEBS JOURNAL Vol: 279, SI pp: 269-270, SEP 2012 (conferință cu rezumat în ISI)

Referințe bibliografice selective

3. D. W. Han, M. H. Lee, H. H. Kim et al., "Epigallocatechin-3-gallate regulates cell growth, cell cycle and phosphorylated nuclear factor-kappa B in human dermal fibroblasts", *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 32, pp. 637-646, 2011.
4. H. Nakagawa, K. Hasumi, J. T. Woo, K. Nagai, and M. Wachi, "Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate". *Carcinogenesis*, vol. 25, pp. 1567-1574, 2004.
5. S. Matzno, Y. Yamaguchi, T. Akiyoshi, T. Nakabayashi, and K. Matsuyama, "An attempt to evaluate the effect of vitamin K3 using as an enhancer of anticancer agents", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 31, pp. 1270-1273, 2008.
6. D. Chen, K. G. Daniel, M. S. Chen, D. J. Kuhn, K. R. Landis-Piwowar, and Q. P. Dou, "Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells", *Biochemical Pharmacology*, vol. 69, pp. 1421-1432, 2005.
7. J. H. Jeong, J. Y. An, Y. T. Kwon, J. G. Rhee, and Y. J. Lee, "Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression", *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 106, pp. 73-82, 2009.
8. G. C. Yen, P. D. Duh, H. L. Tsai, and S. L. Huang, "Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 67, pp. 1215-1222, 2003.
9. Baran, C. Ganea, A. Scordino et al., "Effects of menadione, hydrogen peroxide and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells", *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 58, pp. 169-179, 2010.
10. Baran, Irina; Ganea, Constanta; et al., Detailed Analysis of Apoptosis and Delayed Luminescence of Human Leukemia Jurkat T Cells after Proton Irradiation and Treatments with Oxidant Agents and Flavonoids, **OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY**, Article Number: 498914, DOI: 10.1155/2012/498914 Published: 2012
11. S. Tudisco, A. Scordino, G. Privitera, I. Baran, and F. Musumeci, "ARETUSA – advanced research equipment for fast ultraweak luminescence analysis: new developments", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, vol. 518, pp. 463-464, 2004.
12. I. Baran, C. Ganea, A. Scordino et al., "Apoptosis, cell cycle and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells under proton-irradiation and oxidative stress conditions", in *Activity Report Istituto Nazionale Di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali Del Sud*, Arti Grafiche Le Ciminiere Catania, Italia, pp. 246-249, 2010.
13. L. C. Wilms, J. C. Kleinjans, E. J. Moonen, and J. J. Briedé, "Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro", *Toxicology In Vitro*, vol. 22, pp. 301-307, 2008.
14. M. L. Verkhovskaya, N. Belevich, L. Euro, M. Wikström, and M. I. Verkhovsky, "Real-time electron transfer in respiratory complex I", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, pp. 3763-3767, 2008.
15. M. A. Ortner, B. Ebert, E. Hein et al., "Time gated fluorescence spectroscopy in Barrett's oesophagus", *Gut*, vol. 52, pp. 28-33, 2003.
16. F. Musumeci, L. A. Applegate, G. Privitera, A. Scordino, S. Tudisco, and H. J. Niggli, "Spectral analysis of laser-induced ultraweak delayed luminescence in cultured normal and tumor human cells: temperature dependence", *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, vol. 79, pp. 93-99, 2005.
17. H. W. Kim, S. B. Sim, C. K. Kim, J. Kim, C. Choi, H. You, and K. S. Soh, "Spontaneous photon emission and delayed luminescence of two types of human lung cancer tissues: adenocarcinoma and squamous cell carcinoma", *Cancer Letters*, vol. 229, pp. 283-289, 2005.
18. W. Kemmer, K. Wan, S. Rüttinger et al., "Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer", *FASEB Journal*, vol. 22, pp. 500-509, 2008.

Director proiect,

Prof. Dr. Constanța Ganea