

Raport științific

privind implementarea proiectului PCE Idei nr. 342/2011 în perioada octombrie 2011 – octombrie 2013

Sinteza

Studii privind corelația dintre fluorescența quercetinei și capacitatea acesteia de a induce eliberarea de Ca^{2+} de celulele Jurkat T. Caracterizarea quercetinei ca indicator fluorescent al activității receptorului rianodinic RyR3 în limfoblaști Jurkat (fazele I și III ale proiectului)

INTRODUCERE. O serie de cercetări efectuate în ultimele decenii au pus în evidență efectele benefice pentru sănătate ale flavonoizilor naturali. Flavonoizii naturali se găsesc frecvent în fructe, legume și ceai și s-a constatat că posedă proprietăți cardioprotectoare, anticancer, antiinflamatoare și antialergice [1, review și referințele incluse]. Dintre acești flavonoizi, ne-am propus să studiem epigallocatechina-3-galată (EGCG) și quercetina (QC; 3,5,7,3',4'-pentahidroflavona) și anume modul în care acestea interacționează cu celulele leucemiei umane, limfoblaștii Jurkat T. S-a arătat că acești doi flavonoizi pot inhiba proliferarea celulară și induce apoptoza în diferite tipuri de cancer [1-7]. 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 [3,5-7]. Această proprietate recomandă utilizarea celor doi flavonoizi fie în prevenirea diferitelor tipuri de cancer, în particular a leucemiei, fie pentru a crește eficiența chimioterapiei în tratamentul acestora. Întrucât datele disponibile până în prezent privind efectele acestor compuși asupra ciclului celular și apoptozei/necrozei în celulele Jurkat T sunt extrem de limitate și neomogene, ne-am propus să efectuăm o serie de studii care să clarifice mecanismele care stau la baza interacțiunilor acestor flavonoizi cu celulele leucemice, singuri sau în combinație cu agenți chimioterapeutici. Asemenea cercetări au fost începute în cadrul unui proiect anterior (Idei nr. 1138/2009) și rezultatele obținute ne-au determinat să continuăm acest domeniu de studiu și, chiar mai mult, au sugerat abordarea unei noi direcții de cercetare, respectiv încercarea de a elucidă rolul canalelor de eliberare a calciului din ER/SR în inducerea apoptozei celulare. Dintre rezultatele obținute în proiectul anterior (soldate cu publicarea a 7 articole ISI și a 9 articole BDI) ar fi de menționat cele care pun în evidență rolul QC și EGCG în inducerea apoptozei în celulele Jurkat T, efectele combinate cu agentul chimioterapeutic menadionă (MD) sau efectul inhibitorului respirației mitocondriale rotenon [4,8,9]. Un rezultat extrem de interesant care, așa cum am menționat anterior, va constitui o nouă linie de cercetare, se referă la declanșarea unui semnal de calciu în urma aplicării a 50 μ M QC în celulele Jurkat [10].

În prima fază a proiectului, ne-am propus să examinăm modul în care quercetina, care este slab fluorescentă în soluții apoase, își modifică fluorescența în urma pătrunderii în celulele Jurkat T și să examinăm mai îndeaproape corelația dintre aplicarea quercetinei și semnalul de calciu generat. S-a arătat că QC se leagă de proteine celulare încă neidentificate și astfel se acumulează în mari cantități în citosolul și mitocondriile celulelor Jurkat T [10,11]. În faza a treia a proiectului, am pus în evidență modul în care, utilizând quercetina ca o probă fluorescentă, este posibil să monitorizăm activitatea receptorului rianodinic RyR3 și să calculăm probabilitatea de deschidere a canalului *in situ*. Rezultatele obținute constituie o **premieră** și au fost publicate în revista *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology* [12]. Articolul a primit distincția „**Global Medical Discovery**” la secțiunea „Key Scientific Articles” („Global Medical Discovery (ISSN 1929-8536)

MATERIALE ȘI METODE. Celulele Jurkat T de leucemie umană au fost cultivate în mediu RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 unități/ml penicilină și 100 μ g/ml streptomycină, la 37°C, într-un incubator umidificat cu o atmosferă de 5% CO_2 . Soluția de tip extracelular (ECS) a conținut 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM HEPES, 10 mM glucoză, pH 7.2/NaOH. Soluția de tip intracelular (ICS) a conținut 140 mM KCl, 4 mM NaCl, 0.14 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$, 20 mM

HEPES, pH 7.2/NaOH. Nivelul de Ca^{2+} liber în soluții a fost calculat folosind softul WEBMAXCLITE v1.15. Evaluarea $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ în celulele intacte a fost realizată așa cum s-a descris în [10], cu modificări minore. Celulele au fost încărcate cu $4 \mu\text{M}$ fura-2/AM timp de 10-15 min. la întuneric și la 24-25°C, apoi spălate, resuspendate în ECS, și incubate la 37°C timp de încă 45 min. Fluorescența s-a înregistrat cu un spectrofluorimetru Horiba Jobin Yvon. Pulsurile de excitație s-au repetat la fiecare 20-28 s. Parametrii de emisie/excitație au fost 495 nm/340 nm și 495 nm/380 nm pentru fura-2, 560 nm/380 nm și 560 nm/440 nm pentru QC, 420 nm/380 nm pentru NADH și 470 nm/440 nm pentru flavinele mitocondriale (FLV). Quercetina a fost adăugată după o perioadă inițială de pre-echilibrare (~45 min. de înregistrări) când semnalul de fluorescență a devenit stabil. Calibrarea s-a realizat prin adăugarea a $35 \mu\text{M}$ digitonină timp de 15-20 min., și apoi a 10 mM EGTA în două trepte de 15-20 min. fiecare. Pentru evaluarea dependenței de Ca^{2+} și de QC a activității canalului, celulele au fost spălate, resuspendate în ICS și evaluarea prin spectrofluorimetrie s-a făcut imediat. Unde era indicat, nivelul de Ca^{2+} inițial în eșantionul de lucru a fost ajustat cu EGTA. În experimentele fără fura-2 fluorescența QC a fost colectată la 540 nm și a fost separat corectată pentru autofluorescența măsurată în eșantioane control separate, și la fel pentru interferența NADH/FLV evaluată în eșantionul de lucru. Cele două metode de corecție sunt echivalente în limita erorilor (alte detalii în raportul de fază pe 2011 și în [10, 12, 23]).

REZULTATE ȘI DISCUȚII (faza I-a). Pe baza rezultatelor preliminare obținute anterior [10], am reluat experimentele privind apariția unui semnal de calciu în urma pătrunderii quercetinei în celulele Jurkat T intacte. Într-adevăr, măsurătorile de fluorescență a celulelor încărcate cu fura-2/AM, indică o eliberare susținută de calciu din rezervoarele intracelulare, generând astfel un semnal bifazic distinct de Ca^{2+} indus de $50 \mu\text{M}$ QC (Fig. 1a). Pentru a stabili cu certitudine dacă acesta este într-adevăr un semnal de calciu și nu un artefact, am folosit un inhibitor al canalelor de calciu, ruthenium red (RR). După cum se observă din Fig. 1b, în aceleași condiții experimentale, semnalul de calciu este inhibat. Mai mult, RR este un inhibitor specific al receptorului rianodinic (RyR) și nu al receptorului de inositol trifosfat (IP3).

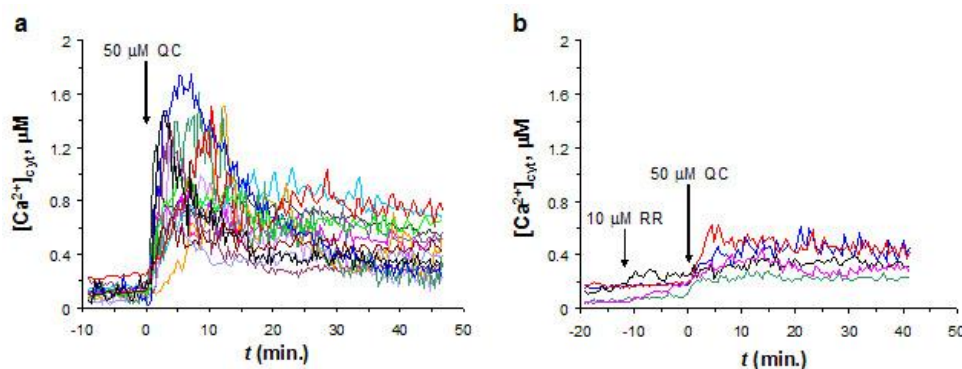


Fig. 1. Semnale de fluorescență induse de $50 \mu\text{M}$ QC în celulele Jurkat. Trasee Individuale de semnale de Ca^{2+} induse de $50 \mu\text{M}$ QC în celulele Jurkat încărcate cu fura-2 obținute în 14 experimente separate (a) și în prezența a $10 \mu\text{M}$ RR în 5 experimente independente (b). Semnalele au fost calibrate la sfârșitul fiecărui experiment. Emisia a fost colectată la 420 nm, cu excitație la 360 nm. Semnalele au fost corectate pentru fluorescența de fond.

Spectrele de fluorescență măsurate într-o lucrare anterioară [10], au evidențiat o scădere a nivelului de NADH în celulele Jurkat T intacte expuse la $50 \mu\text{M}$ QC. Am făcut un pas mai departe în această cercetare și am măsurat nivelul de NADH, în condițiile modificării concentrației de calciu intracelular, respectiv am comparat evoluția acestui nivel în celule intacte, celule permeabilizate cu digitonină și apoi la adăugarea EGTA. Am constatat că, în toate aceste situații, în mod invariabil nivelul de NADH scade (Fig. 2).

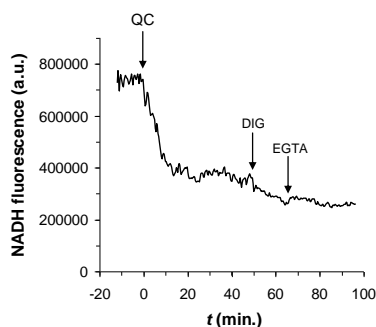


Fig. 2. Evoluția în timp a fluorescenței NADH după adăugarea în suspensia de celule Jurkat a $50 \mu\text{M}$ QC, apoi a $35 \mu\text{M}$ digitonină (DIG) și, în final, a 10 mM EGTA.

Am examinat în continuare, dezvoltând linia de cercetare anterioară [10], modul în care se modifică fluorescența quercetinei în funcție de concentrația de calciu din celule. În cercetările noastre anterioare [10] am observat că lungimile de undă la care spectrele de excitare ale quercetinei intracelulare prezintă maxime se află în jur de 380 nm, respectiv 440 nm. Spectrul de emisie prezintă un maxim în jurul valorii de 540 nm. Ne-am propus să examinăm mai în detaliu evoluția acestor spectre în funcție de concentrația de calciu în celulă.

Pentru a caracteriza mai bine proprietățile fluorescente ale quercetinei intracelulare, am monitorizat modificările spectrelor de fluorescență ale acesteia în urma expunerii celulelor Jurkat intacte la 50 μM QC și după permeabilizarea celulei cu digitonină. Fig. 3 ilustrează un exemplu de spectre de fluorescență de emisie ale QC, în celule intacte și în celule Jurkat permeabilizate, obținute în urma excitării cu 380 nm și respectiv 440 nm. Toate spectrele prezintă un maxim proeminent la ~535-540 nm, specific formelor tautomerice ale quercetinei [13].

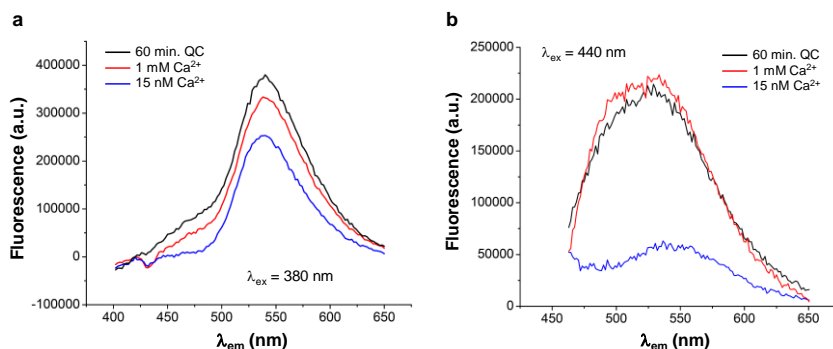


Fig. 3. Spectrele de fluorescență de emisie ale QC în celule Jurkat intacte și permeabilizate. Excitarea s-a făcut la 380 nm (a) și 440 nm (b). Spectrele au fost înregistrate la 60 min. după expunerea celulelor intacte la 50 μM QC (traseul negru), după permeabilizarea în 1 mM Ca²⁺ (traseul roșu) ori în 15 nM Ca²⁺ (traseul albastru). Aceste rezultate au fost obținute prin medierea a 4 experimente reprezentative independente.

În Fig.4 este redat un set reprezentativ de spectre de excitare ale quercetinei în celule intacte și permeabilizate, precum și analiza prin intermediul unei descompunerii Gaussiene. În domeniul care ne interesează se află cele două benzi centrate pe ~380 nm și ~440 nm, respectiv (Fig. 4, Tabel 1). Datele de fluorescență au fost fitate cu ecuația:

$$y = y_0 + A_1/w_1/(\pi/2)^{1/2} \exp\{-2[(\lambda_{ex} - \lambda_1)/w_1]^2\} + A_2/w_2/(\pi/2)^{1/2} \exp\{-2[(\lambda_{ex} - \lambda_2)/w_2]^2\} + A_3/w_3/(\pi/2)^{1/2} \exp\{-2[(\lambda_{ex} - \lambda_3)/w_3]^2\}$$

unde y reprezintă fluorescența emisă la 540 nm, y_0 reprezintă o componentă de fluorescență reziduală, A_1, A_2, A_3 și $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ sunt amplitudinile și respectiv lungimile de undă ale celor trei maxime de excitare. Parametrii rezultați din cel mai bun fit sunt prezentați în Tabelul 1.

Tabelul 1. Parametrii de fluorescență de excitare ai quercetinei intracelulare

Condiții	y_0	A_1	w_1 (nm)	λ_1 (nm)	A_2	w_2 (nm)	λ_2 (nm)	A_3	w_3 (nm)	λ_3 (nm)
60 min. QC	765	8359997	45.7	312.1	22845346	53.4	381.8	12725602	55.6	434.8
1 mM Ca ²⁺	3570	4902427	34.5	314.9	20175523	49.9	381.6	12646700	51.1	438.4
15 nM Ca ²⁺	2751	n.d.	n.d.	n.d.	16938566	49.1	381.6	1753912	36.1	444.1

n.d., nedeterminat

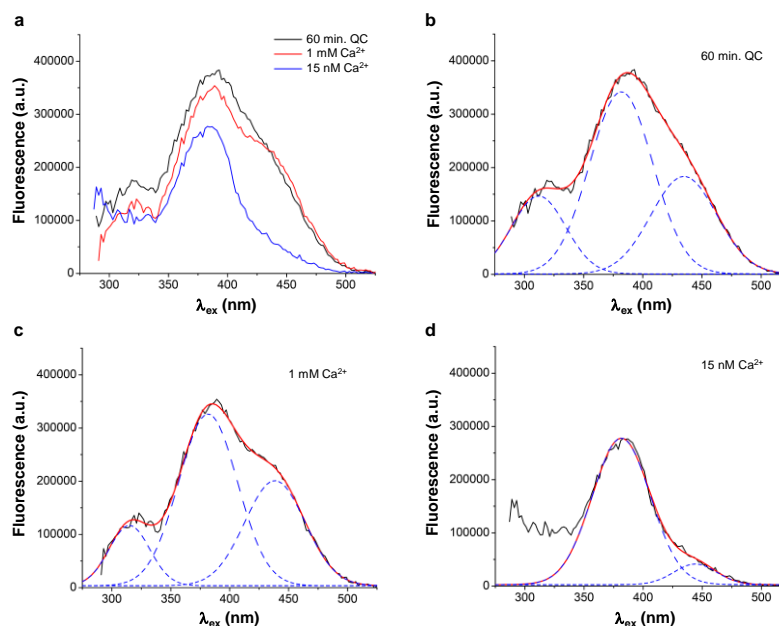


Fig. 4. Spectrele de fluorescență de excitare ale QC în celule intacte și permeabilizate. Emisia a fost înregistrată la 540 nm. **a**, Spectrele au fost înregistrate la 60 min. după expunerea celulelor intacte la 50 μM QC (traseul negru), după permeabilizarea în 1 mM Ca²⁺ (traseul roșu) ori în 15 nM Ca²⁺ (traseul albastru). **b-d**, Deconvoluția Gaussiană a spectrelor de excitare prezentate în **a**. Curba de fitare (roșu) a fost obținută conform cu ecuația 4 cu parametrii din Tabelul 1. Curbele prezentate cu linii întrerupte sunt componentele Gaussiene descrise de ecuația 1. În **d**, nu a fost posibilă determinarea primei componente spectrale. Aceste rezultate sunt obținute în 4 experimente reprezentative independente.

Studiile noastre anterioare [10] au arătat, în acord cu alte studii din literatură [11], că quercetina se acumulează în interiorul celulelor Jurkat și se leagă de proteine intracelulare, prezentând o fluorescență specifică cu emisia la ~540 nm. Astfel, în experimentele efectuate în prima etapă a proiectului am evidențiat modul specific în care se modifică spectrele de fluorescență de excitare și emisie ale quercetinei intracelulare în funcție de concentrația de calciu intracelular. În plus, am putut demonstra că la aplicarea quercetinei în celule Jurkat intacte se obține un semnal de calciu, iar inhibiția cu ruthenium red indică activarea unui receptor de tip rianodinic. De aici deducem că ar fi posibil ca proteina intracelulară de care se leagă quercetina să fie chiar receptorul rianodinic din reticulul endoplasmic. Ne-am propus ca în cercetările ce urmează să studiem mai îndeaproape în ce măsură ipoteza noastră se confirmă.

Astfel, în **etapa a treia** a proiectului am continuat cercetările anterioare și am arătat, pentru prima dată că spectrofluorimetria convențională permite măsurarea directă a activității canalului de eliberare a calciului, receptorul rianodinic de tip 3 (RyR3), în celule intacte și permeabilizate, și am realizat caracterizarea reglării acestora de către diferiți liganzi in situ. **Descoperirea centrală pentru această metodologie este faptul că flavonoidul quercetină poate fi utilizat ca o probă fluorescentă eficientă pentru a distinge cu mare sensibilitate între configurațiile (stările) închis/deschis ale canalului RyR3.** În acest scop, am utilizat linia celulară leucemică umană Jurkat T, pentru care două laboratoare independente au raportat că exprimă numai izoforma de tip 3 a receptorului rianodinic [14, 15].

REZULTATE ȘI DISCUȚII (faza III-a). În continuarea și pe baza cercetărilor anterioare [10, faza I-a a proiectului], am investigat corelația între semnalul de eliberare de calciu indus de QC și fluorescența emisă de quercetină la 540 nm după excitarea cu două lungimi de undă specifice, 380 nm și 440 nm, respectiv (F380 și F440). 50 μM QC au evocat un semnal bifazic de Ca²⁺ robust și susținut în celulele încărcate cu fura-2 (Fig. 5a), semnal care a fost redus consistent de către ligandul antagonist pentru RyR, dar nu și pentru IP₃R, ruthenium red (RR) (Fig. 5a), indicând faptul că rolul cheie în eliberarea de Ca²⁺ indusă de QC îl joacă receptorul rianodinic. În timpul expunerii continue a celulelor Jurkat la QC, F380 și F440 au crescut progresiv până la un nivel platou, apoi au descrescut în urma permeabilizării celulelor în 1 mM CaCl₂ și au descrescut încă după adăugarea ulterioară a 10 mM EGTA (Fig.

5b). Raportul $Q = F380/F440$ înregistrat în celule intacte după adăugarea QC (Fig. 5c,d, F) a prezentat într-o manieră înalt reproductibilă o evoluție în timp izbitor de asemănătoare cu aceea a nivelului de Ca^{2+} citosolic ($[Ca^{2+}]_{cyt}$). Raportul Q a fost apoi normalizat la valoarea lui maximă (Q_{max}) care s-a obținut în urma permeabilizării celulei în 1 mM $CaCl_2$ și adăugarea consecutivă a 10 mM EGTA (Fig.5c). Raportul rezultat, Q/Q_{max} , reprezintă o bună estimare a probabilității de deschidere a canalului de eliberare a Ca^{2+} , RyR3, și în cele ce urmează vom nota Q/Q_{max} cu P_{open} . Se constată că există o corelație puternică între P_{open} și $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Fig. 5e,f).

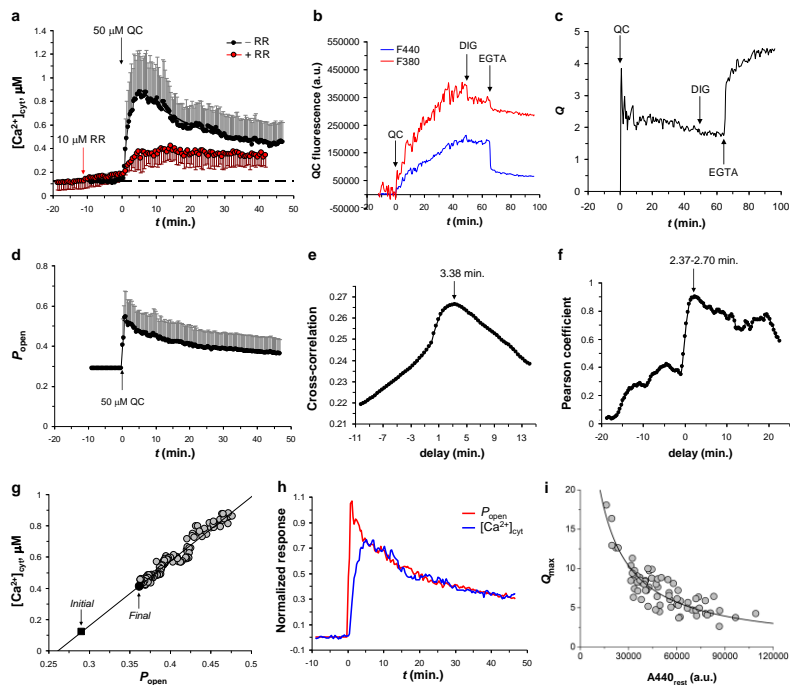


Fig. 5. Raportul fluorescenței QC intracelulare, F380/F440, este puternic corelat cu semnalul de Ca^{2+} evocat de QC în celulele Jurkat intacte. **a**, Semnalul mediu de Ca^{2+} Indus de 50 μM QC în celulele Jurkat încărcate cu fura-2 în absența (-RR) ori în prezența (+RR) a 10 μM ruthenium red. Agenții au fost adăugați la momentele de timp indicate prin săgeți. Datele sunt prezentate ca medii \pm d.s. pentru 14 și respectiv pentru 5 determinări independente. Este indicat și nivelul mediu de repaus obținut în absența RR ($y_i = 122.0 \pm 42.3$ nM) (linia întreruptă). Faza de de scădere a semnalului în absența RR a fost fitată cu funcția $y = y_f + A \exp(-t/\tau)$, cu $y_f = 410.7 \pm 10.4$ nM, $A = 702.6 \pm 19.2$ nM, și $\tau = 15.25 \pm 0.99$ min. (linia continuă). **b**, Trasee reprezentative ale fluorescenței QC, și **c**, ale raportului F380/F440 (Q) rezultat după excitarea la 380 nm (F380) și 440 nm (F440) după adăugarea a 50 μM QC, 35 μM digitonină (DIG) și 10 mM EGTA la momentele de timp indicate. Celulele nu au fost încărcate cu fura-2. **d**, Evoluția în timp a raportului Q (P_{open}) calibrat înainte și după adăugarea a 50 μM QC. Valoarea înainte stimulării a fost derivată din datele arătate în **g**. Datele înregistrate după stimulare reprezintă media \pm d.s. a 19 determinări independente, dintre care 9 au fost făcute pentru celule încărcate cu fura-2 și 10 fără fura-2. Faza de de scădere a semnalului a fost fitată cu funcția $y = y_f + A \exp(-t/\tau)$, cu $y_f = 0.3619 \pm 0.0017$, $A = 0.1686 \pm 0.0020$, și $\tau = 14.76 \pm 0.51$ min. (linia continuă). În **a-d**, semnalele au fost corectate pentru autofluorescență. **e**, Cross-corelația, și **f**, corelația Pearson dintre P_{open} și $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ca funcție de întârzierea dintre cele două semnale. Au fost utilizate datele din panelurile **a** și **d** înregistrate după stimulare ($t > 0$). Întârzierea pentru care este atins maximul fiecărei funcții este indicată prin săgeți. **g**, Corelația lineară dintre $[Ca^{2+}]_{cyt}$ și P_{open} după >4 min. de la adăugarea QC. A fost utilizat fitul linear cu datele (linia continuă; $y = 4.1294x - 1.0778$) pentru a calcula $P_{open}^{rest} = 0.2905$ în celulele în repaus (starea “inițială” este marcată cu un pătrat), presupunând un nivel bazal de 122.0 nM Ca^{2+} . Coordonatele stării asimptotice (“finale”) indicate prin cercul negru au fost extrase din valorile y_f indicate în panelurile **a** și **d**. **h**, Răspunsul normalizat pentru $[Ca^{2+}]_{cyt}$ și P_{open} . Creșterea relativă normalizată la maximul său a fost calculată pentru fiecare cantitate ca fiind $(y - y_i)/(A + y_f - y_i)$, cu A , y_f și y_i indicate în panelurile **a**, **d** și **g**. **i**, Curba de calibrare a Q_{max} ca funcție de autofluorescența celulelor în stare de repaus fără fura-2 excitate la 440 nm ($A440_{rest}$). Datele au fost fitate cu funcția $y = (a + bx)^{-1}$, cu $a = 0.01784 \pm 0.00521$ și $b = (2.627 \pm 0.163) \times 10^{-6}$. Coeficientul de corelație Pearson asociat cu aceste date a fost -0.78. Au fost realizate $n = 10$ experimente cu 50 μM QC așa cum s-a descris în **c**, $n = 45$ experimente au fost efectuate cu suspensii celulare în ICS stimulate cu 5 μM QC așa cum s-a descris în Fig. 2a-b, și $n = 8$ și 7 determinări au fost efectuate cu suspensii celulare în ICS stimulate cu până la 10 μM QC cum s-a descris în Fig. 7.

Dependența de Ca^{2+} a F380/F440 relevă forma caracteristică de clopot a RyR3. Câteva înregistrări tipice la diferite niveluri descrescătoare de Ca^{2+} în celulele permeabilizate sunt prezentate în Fig. 6a. După adăugarea

secvențială de EGTA, Q a prezentat răspunsuri tranziente stabile în <10 min., pe o scală de timp semnificativ mai rapidă decât cea observată în celulele intacte. Remarcabil, dependența P_{open} în starea staționară de nivelul de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_{bulk}$, (Fig. 6b) apare a fi foarte asemănătoare cu dependența în formă de clopot care este specifică receptorului RyR3 în bistraturi lipidice [16-19], cu un P_{open} ridicat ($\sim 0.8-1$) atins la nivelurile de Ca^{2+} optime și o dependență abruptă de Ca^{2+} pe ambele părți ale curbei.

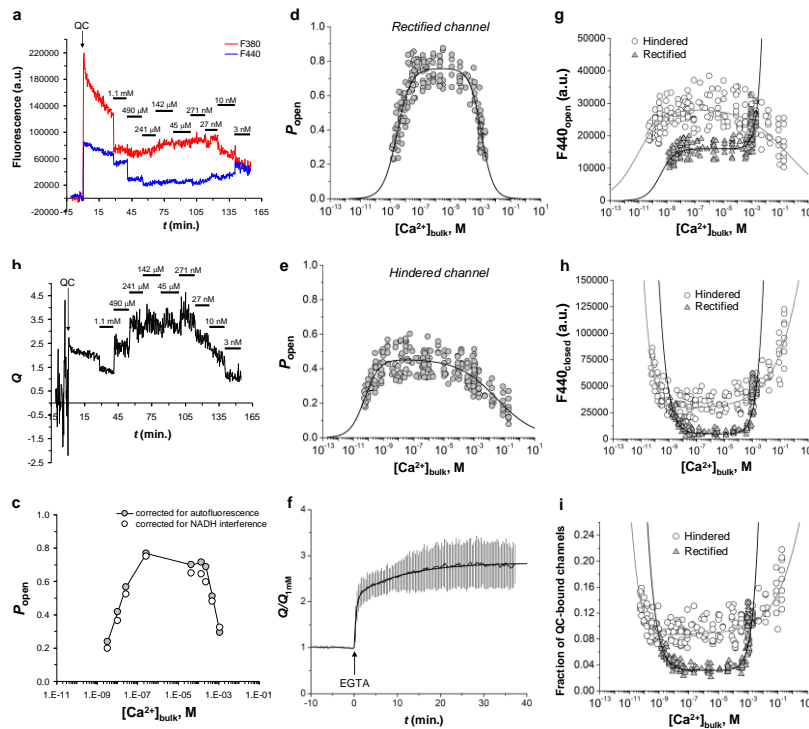


Fig. 6. Dependența de Ca^{2+} a P_{open} relevă forma de clopot caracteristică pentru RyR3. **a**, Înregistrare tipică a raportului Q în celulele permeabilizate pentru diferite niveluri de Ca^{2+} citosolic (indicate lângă barele orizontale) ajustate prin adăugarea secvențială de $CaCl_2$ ori EGTA. Celulele au fost mai întâi permeabilizate timp de 15 min. în ICS conținând $140 \mu M Ca^{2+}$ și apoi stimulate cu $5 \mu M QC$ la $t = 0$ (săgeata). Valorile de stare quasi-staționară pentru Q extrase din date au fost normalizate la valoarea maximă ($Q_{max} = 5.19$) observată după adăugarea QC , consistent cu curba de calibrare standard prezentată în Fig. 5i. **b**, Datele de ansamblu pentru P_{open} ca funcție de $[Ca^{2+}]_{bulk}$, obținute din 45 de experimente efectuate similar cu cele descrise în **a**. Datele au fost fitate cu ecuația $y = P_{max} \times x^{HA1} / (x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) \times K_{dl}^{HI} / (x^{HI} + K_{dl}^{HI})$, cu $P_{max} = 0.758 \pm 0.012$, $K_{dA1} = 2.72 \pm 0.22$ nM, $HA1 = 0.94 \pm 0.04$, $K_{dl} = 1.13 \pm 0.07$ mM, $HI = 1.10 \pm 0.12$. **c**, Datele de ansamblu pentru P_{open} ca funcție de $[Ca^{2+}]_{bulk}$, obținute din 42 de experimente separate în care $[Ca^{2+}]_{bulk}$ a fost fie crescut fie descrescut de la o valoare inițială de $1-140 \mu M$. Datele au fost fitate cu aceeași ecuație ca în **b**, cu $P_{max} = 0.457 \pm 0.008$, $K_{dA1} = 57.0 \pm 7.0$ pM, $HA1 = 0.90 \pm 0.09$, $K_{dl} = 29.4 \pm 4.7$ mM, $HI = 0.34 \pm 0.03$. **d**, Frațiunea de canale care leagă QC depinde bifazic de Ca^{2+} . Fluorescența totală $F440$ obținută în experimente efectuate cum s-a descris în **b** (canalul rectificat, $n = 24$) ori în **c** (canalul suprimat (hindered), $n = 31$) a fost divizată cu valoarea maximă $F440_{max}$ indicată în Fig. 7c. Curbele de fitare au fost obținute prin sumarea curbelor de conformație închisă sau deschisă arătate în **e** și **f**, respectiv, urmate de normalizare la $F440_{max}$. **e**, Dependența de Ca^{2+} a fluorescenței emise de canalele care au legat QC în conformație deschisă ($F440_{open}$). Datele au fost fitate cu ecuațiile $y = F_{Om} \times x^{HA1} / (x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) \times K_{dl}^{HI} / (x^{HI} + K_{dl}^{HI})$, cu $F_{Om} = 28555.6 \pm 237.6$, $K_{dA1} = 12.3 \pm 4.1$ pM, $HA1 = 0.46 \pm 0.01$, $K_{dl} = 487.8 \pm 25.5$ mM, $HI = 0.31 \pm 0.02$ (canalul suprimat), și $y = F_{O1} \times x^{HA1} / (x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) + (F_{Om} - F_{O1}) \times x^{HA2} / (x^{HA2} + K_{dA2}^{HA2})$, cu F_{Om} set to 28555.6, și $F_{O1} = 16091.9 \pm 119.3$, $K_{dA1} = 298.6 \pm 77.0$ pM, $HA1 = 0.81 \pm 0.01$, $K_{dA2} = 1.40 \pm 0.13$ mM, $HA2 = 2.23 \pm 0.08$ (canalul rectificat). **f**, Dependența de Ca^{2+} a fluorescenței emise de canalele ce au legat QC în conformație închisă ($F440_{closed}$). Datele pentru canalul suprimat au fost fitate cu ecuația $y = F_{Cm} \times \{1 - [P_{C1} \times x^{HA1} / (x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) + (1 - P_{C1}) \times x^{HA2} / (x^{HA2} + K_{dA2}^{HA2})] \times K_{dl}^{HI} / (x^{HI} + K_{dl}^{HI})\}$, cu $F_{Cm} = 334603.0 \pm 7617.3$, $P_{C1} = 0.9068 \pm 0.0053$, $K_{dA1} = 8.27 \pm 1.15$ pM, $HA1 = 0.95 \pm 0.02$, $K_{dA2} = 30.3 \pm 6.0$ mM, $HA2 = 0.59 \pm 0.08$, $K_{dl} = 3.45 \pm 0.17$ M, $HI = 0.34 \pm 0.01$. Datele pentru canalul rectificat au fost fitate cu ecuația $y = F_{Cm} \times [1 - P_{C1} \times x^{HA1} / (x^{HA1} + K_{dA1}^{HA1}) \times K_{dl}^{HI} / (x^{HI} + K_{dl}^{HI})]$, cu $F_{Cm} = 325302.3 \pm 10923.1$, $P_{C1} = 0.9854 \pm 0.0019$, $K_{dA1} = 105.8 \pm 10.4$ pM, $HA1 = 0.89 \pm 0.01$, $K_{dl} = 8.25 \pm 0.47$ mM, $HI = 1.23 \pm 0.04$. În **d-f**, au fost alese eşantioane cu densități celulare asemănătoare; media \pm e.m.s. a lui Q_{max} a fost 7.85 ± 1.36 în toate cele $n = 24$ determinări pentru canalul rectificat, și 7.34 ± 1.03 în $n = 22$ experimente cu canalul suprimat efectuate cu $[Ca^{2+}]_{bulk}$ crescătoare înainte de calibrare. Când nu a fost posibilă atingerea rectificării, Q_{max} s-a calculat utilizând curba de calibrare din Fig. 5i. Toate semnalele de fluorescență au fost corectate pentru interferența cu NADH/FLV.

Pentru a atinge niveluri mai scăzute de Ca^{2+} citosolic și a reduce astfel timpul de înregistrare, s-a efectuat un tip de experimente ușor diferit în care celulele au fost permeabilizate în 1-140 μM CaCl_2 . În mod neașteptat, orice adăugare ulterioară de EGTA sau CaCl_2 nu a dus la rezultatele descrise mai sus. Curba corespunzătoare a P_{open} a rămas cu formă de clopot dar P_{open} maxim s-a redus la jumătate, domeniul de activare al $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bulk}}$ s-a lărgit considerabil și legarea Ca^{2+} la situsul său inhibitor a prezentat o cooperativitate negativă (Fig. 6c). Luată împreună, aceste observații identifică un nou mecanism reglator prin care activitatea canalului în condiții fiziologice este parțial suprimată (canal suprimat (hindered)) în timp ce canalul devine activat maximal după expunerea la concentrații milimolare de Ca^{2+} citosolic urmat de o chelare a Ca^{2+} .

Afinitatea RyR3 pentru Ca^{2+} și QC în conformație închisă/deschisă. Am analizat în detaliu proprietățile acestor aspecte ale reglării RyR3 prin evaluarea dependenței fluorescenței emise de către canalul la care s-a legat QC de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bulk}}$ (Fig. 6d-f) și de concentrația citosolică de quercetină, $[\text{QC}]_{\text{cyt}}$ (Fig. 7), în configurația închisă sau deschisă.

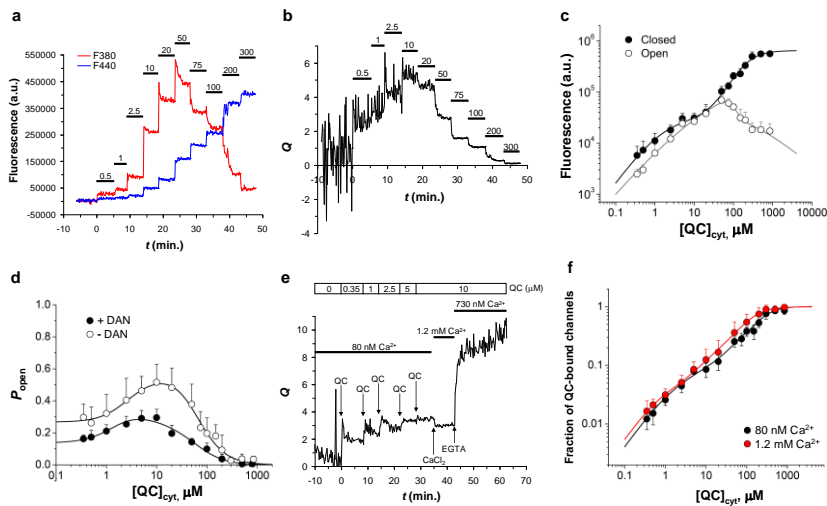


Fig. 7. Reglarea bifazică a P_{open} de către quercetină. **a**, Trasee tipice ale fluorescenței emise de către canalele care au legat QC, F380 (roșu) și F440 (albastru), și **b**, raportul Q înregistrat pentru celulele permeabilizate la niveluri crescătoare de QC citosolic (indicate lângă barele orizontale) ajustate prin adăugarea secvențială de quercetină. Celulele au fost mai întâi permeabilizate timp de 15 min. în ICS conținând 80 nM Ca^{2+} și apoi stimulate cu QC la $t = 0$. **c**, dependența de QC a fluorescenței emise de către canalele care au legat QC în conformație deschisă sau închisă (cercuri deschise sau închise, respectiv). Datele au fost obținute ca media \pm e.m.s. a 8-16 determinări similare celor descrise în **a**. Toate eșantioanele au avut densități similare de celule. Media \pm e.m.s. pentru Q_{max} a fost 7.41 ± 1.27 în $n = 8$ experimente în care Q_{max} a putut fi evaluat după rectificare într-un nivel final de 100 nM Ca^{2+} și 10 μM QC. În restul experimentelor Q_{max} a fost calculat utilizând curba de calibrare din Fig. 5i. Datele pentru conformația închisă au fost fitate cu ecuația: $y = F440_{\text{max}} [P_{\text{C1}'} x^{H1}/(x^{H1} + K_{d1}^{H1}) + (1 - P_{\text{C1}'}') x^{H2}/(x^{H2} + K_{d2}^{H2})]$, cu $F440_{\text{max}} = 647652.3 \pm 17184.9$, $P_{\text{C1}'} = 0.0469 \pm 0.0039$, $K_{d1} = 1.54 \pm 0.19 \mu\text{M}$, $H1 = 1.04 \pm 0.06$, $K_{d2} = 194.4 \pm 9.2 \mu\text{M}$, $H2 = 1.63 \pm 0.13$. Datele obținute pentru conformația deschisă au fost fitate cu ecuația: $y = F440_{\text{max}} x^H/(x^H + K_d^H) [P_{\text{C1}'} x^{H1}/(x^{H1} + K_{d1}^{H1}) + (1 - P_{\text{C1}'}') x^{H2}/(x^{H2} + K_{d2}^{H2})]$, cu $F440_{\text{max}}$ pus la 647652.3, și $K_d = 255.1 \pm 30.7 \mu\text{M}$, $H = 0.79 \pm 0.02$, $P_{\text{C1}'} = 0.623 \pm 0.052$, $K_{d1} = 3.52 \pm 0.23 \mu\text{M}$, $H1 = 0.52 \pm 0.02$, $K_{d2} = 88.9 \pm 4.2 \mu\text{M}$, $H2 = 3.66 \pm 0.51$. **d**, Dependența P_{open} de $[\text{QC}]_{\text{cyt}}$ în prezența (+DAN) ori în absența (-DAN) a 10 μM dantrolen. Datele reprezintă media \pm e.m.s. a 4-16 și 8-16 determinări separate, respectiv. Ambele seturi de date au fost fitate cu ecuația $y = [P_0 + (1 - P_0) x^{HA}/(x^{HA} + K_{dA}^{HA})] K_{dI}^{HI}/(x^{HI} + K_{dI}^{HI})$, cu $P_0 = 0.268 \pm 0.017$, $K_{dA} = 60.8 \pm 3.3 \mu\text{M}$, $HA = 1.60 \pm 0.07$, $K_{dI} = 2.24 \pm 0.31 \mu\text{M}$, $HI = 1.54 \pm 0.06$ (-DAN), și $P_0 = 0.137 \pm 0.021$, $K_{dA} = 73.2 \pm 5.2 \mu\text{M}$, $HA = 1.49 \pm 0.15$, $K_{dI} = 1.70 \pm 0.47 \mu\text{M}$, $HI = 1.63 \pm 0.16$ (+DAN). **e**, Traseu reprezentativ al raportului Q înregistrat pentru celule permeabilizate în prezența a 10 μM dantrolen după adăugarea secvențială a QC așa cum se indică. Semnalul a fost calibrat prin adăugarea de CaCl_2 și EGTA la momentele de timp indicate. Sunt indicate nivelurile de Ca^{2+} liber și QC în diferiții pași. Celulele au fost mai întâi permeabilizate timp de 15 min. în ICS conținând 80 nM Ca^{2+} , apoi s-au adăugat 10 μM DAN, și după încă 15 min. celulele au fost stimulate cu QC (la $t = 0$). **f**, Frațiunea de canale care au legat QC crește cu $[\text{QC}]_{\text{cyt}}$. Măsurătorile au fost efectuate cu două niveluri diferite de Ca^{2+} citosolic, 80 nM (roșu) și 1.2 mM (negru). Fluorescența totală F440 obținută din datele arătate în **c** a fost divizată cu $F440_{\text{max}}$ indicat în **c**. Curbele continue pentru 80 nM ori 1.2 mM Ca^{2+} au fost calculate prin însumarea celor două curbe fitate arătate în **c**, și apoi prin divizarea rezultatului cu $F440_{\text{max}}$ corespunzător. Toate semnalele de fluorescență au fost corectate pentru interferența cu NADH/FLV.

Pentru a discrimina între fluorescența emisă de canal în configurațiile deschisă sau închisă, trebuie mai întâi să subliniem faptul că atunci când toate canalele RyR3 dintr-un eșantion dat de celule sunt complet activate, raportul F380/F440 este egal cu Q_{\max} . Bazat pe invariabilitatea lărgimii benzii de excitare de la 380 nm cu condițiile de tratament (raportul din 2011, [12]) o implicație importantă cu aplicabilitate generală este aceea că raportul $F380/Q_{\max}$, notat cu $F440_{\text{open}}$, reprezintă contribuția la F440 a canalelor care se găsesc în configurație deschisă. Atunci, contribuția corespunzătoare a canalelor în configurație închisă va fi $F440_{\text{closed}} = F440 - F440_{\text{open}}$. Analiza datelor, coroborată cu câteva linii de evidență, sugerează că F380 și F440 sunt proporționale cu numărul de canale care leagă QC și nu cu numărul de molecule de QC care se leagă de canale. În consecință, fracțiunea de canale care se găsesc în conformație deschisă sau închisă poate fi ușor determinată prin $F440_{\text{open}}$ ori $F440_{\text{closed}}$ la valoarea maximă a F440, $F440_{\max}$. Această valoare maximă poate fi obținută la niveluri de quercetină saturante ($>300 \mu\text{M}$) și apare a fi invariabilă la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{bulk}}$ activatoare sau inhibitoare (Fig. 7c). Datele indică existența a două clase distincte de locuri de legare pentru Ca^{2+} care afectează legarea quercetinei la receptor în conformația sa închisă în moduri opuse: un situs de mare afinitate pentru Ca^{2+} (A1) care inhibă legarea QC de receptor, și unul de afinitate scăzută (I) care stimulează legarea QC. Acest mecanism de funcționare pare să opereze atât în canalul suprimat cât și în cel rectificat (Fig. 6f). În configurație deschisă, canalul suprimat prezintă o imagine inversată a dependenței fluorescenței de $[\text{QC}]_{\text{cit}}$ (Fig. 6e) aspect care este consistent cu scenariul unei cuplări alosterice. Un tablou surprinzător diferit se poate observa la canalul deschis rectificat, care relevă o a doua clasă de situsuri activatoare de legare a Ca^{2+} operaționale, de joasă afinitate (A2), în timp ce nu se poate distinge niciun situs aparent inhibitor (Fig. 6e). Dependența F380 și F440 de nivelul de flavonoid (Fig. 7a-c) a pus în evidență trăsături interesante ale reglării canalului de către quercetină. Datele obținute cu $80 \text{ nM } \text{Ca}^{2+}$ citosolic indică faptul că în conformația închisă a receptorului sunt funcționale două clase distincte de locuri de legare inhibitoare pentru QC (IQ1 și IQ2), cu constantele de disociere (K_d) corespunzătoare de $1.54 \mu\text{M}$ și $194.4 \mu\text{M}$, și coeficienții Hill (H) de 1.04 și 1.63, respectiv (Fig. 7c). Diferența consistentă între abundența relativă a celor două stări închise corespunzătoare ale receptorului indică faptul că la saturarea cu quercetină timpul mediu petrecut în starea închisă de joasă afinitate este de 20.3 mai lung decât timpul mediu petrecut în starea închisă de mare afinitate. Datele de fluorescență arată că în starea închisă niciun situs activator de legare a QC nu este disponibil pentru legare, în timp ce în conformația deschisă pare să opereze un situs activator (AQ) cu $K_d = 255.1 \mu\text{M}$ și $H = 0.79$ (Fig. 7c). Parametrii caracteristici ai celor două locuri de legare inhibitoare în conformația deschisă (K_d : $3.52 \mu\text{M}$ și $88.9 \mu\text{M}$; H : 0.52 și 3.66) indică o modificare semnificativă în afinitatea și numărul moleculelor care leagă QC, sugerând faptul că ar putea avea loc o modificare conformațională la deschiderea canalului. Trebuie notat faptul că parametrii de legare ai IQ2 atât în conformația deschisă cât și în cea închisă sunt similari cu cei preziși pentru locul de legare a QC inhibitor al RyR1 ($K_d = 86\text{-}210 \mu\text{M}$, $H = 4$) [20]. Mai mult, afinitatea AQ stabilită de noi este, de asemenea, similară cu cea estimată pentru RyR1 ($K_d = 300 \mu\text{M}$) într-unul din cele patru moduri de activitate a sa [20]. Ca o consecință a reglării duale manifestate de către quercetină, P_{open} a prezentat o dependență bifazică de nivelul citosolic de quercetină (Fig. 7d). Dantrolenul (DAN), care este un inhibitor al RyR1 și al RyR3 dar nu și al RyR cardiac (RyR2) [21, 22], a redus P_{open} la toate nivelurile de quercetină testate (Fig. 7d,e). Este interesant faptul că efectul inhibitor al DAN ar putea fi depășit prin rectificarea canalului, când se înregistrează o creștere robustă a raportului Q (Fig. 7e). Cu un nivel inhibitor de $1.2 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ dependența de QC a F380, F440, P_{open} și a fracțiunii de canale care leagă QC a fost similară cu cea descrisă mai sus (Fig. 7f). Totuși, pot fi observate diferențe semnificative, în particular cooperativitatea redusă a QC asociată cu IQ2 în conformație închisă și o afinitate crescută a AQ. Detalii suplimentare se găsesc în rapoartele de fază *in extenso* și în articolele rezultate din aceste studii [12, 23].

În concluzie, am arătat că raportul calibrat F380/F440 al semnalului de fluorescență a QC intracelular constituie o măsură fidelă a probabilității de deschidere a canalului de eliberare a calciului RyR3. Acest studiu prezintă prima măsurătoare directă, ne-invazivă a activității de ansamblu a canalului RyR3 în celule intacte și permeabilizate și avansează o metodă simplă, dar robustă și sensibilă de evaluare a proprietăților funcționale și moleculare ale acestui canal ionic *in situ*. Dezvoltarea ulterioară a acestei metode noi ar putea aduce contribuții semnificative la înțelegerea funcției RyR în condiții fiziologice și patologice. Aceste date ridică posibilitatea atractivă a dezvoltării unei noi probe moleculare cu specificitate înaltă pentru receptorul RyR3 în scopul

optimizării protocoalelor de măsurare în cazul microscopiei de fluorescență, citometriei în flux sau al altor tehnici de detecție fluorometrică și încurajează studii ulterioare orientate spre studiul diferitelor canale ionice.

Rezultatele studiilor prezentate mai sus au fost publicate [12], comunicate la conferințe [24, 25] sau acceptate pentru publicare [23]

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE SELECTIVE

1. Kuresh A. Youdim et al., *Biol. Chem.*, Vol. 383, pp. 503 – 519, March /April 2002.
2. Johnson MK, Loo G. 2000. *Mutation Res.* 459: 211-218
3. Han DW et al. 2011. *Acta Pharmacologica Sinica*, doi: 10.1038/aps.2011.17
4. Baran I, Ganea C, Scordino A, Musumeci F, Barresi V et al. 2010. *Cell Biochem Biophys* 58: 169-179
5. Chen D et al. 2005. *Biochem Pharmacol* 69: 1421-1432
6. Jeong JH et al. 2009. *J Cell Biochem* 106: 73-82
7. Yen GC et al. 2003. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1215
8. 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
9. 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
10. 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
11. M. Fiorani, A. Guidarelli, M. Blasa, C. Azzolini, M. Candiracci, E. Piatti, O. Cantoni, *J. Nutr. Biochem.* **21**, 397 – 404 (2010)
12. Irina Baran, Eva Katona, Constanta Ganea, Quercetin as a fluorescent probe for the ryanodine receptor activity in Jurkat cells, *Pfluegers Archiv, European Journal of Physiology*, 2013, DOI 10.1007/s00424-013-1235-y, 465:1101–1119.
13. Sengupta, B., Sengupta, P. K. Binding of quercetin cu human serum albumin: a critical spectroscopic study. *Biopolymers* **72**, 427-434 (2003)
14. Hakamata, Y., Nishimura, S., Nakai, Y. J., Nakshima, Y., Kita, T., Imoto, K. Involvement of the brain type ryanodine receptor in T-cell proliferation. *FEBS Lett.* 352, 206-210 (1994).
15. Guse, A. H., da Silva, C. P., Berg, I., Skapenko, A. L., Weber, K., Heyer, P., Hohenegger, M., Ashamu, G. A., Schulze-Koops, H., Potter, B. V., Mayr, G. W. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* 398, 70-73 (1999).
16. Chen, S. R. W., Li, X., Ebisawa, K., Zhang, L. Functional characterization of the recombinant type 3 Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) expressed in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 24234-24246 (1997).
17. Jeyakumar, L. H., Copello, J. A., O'Malley A. M., Wu, G.-M., Grassucci, R., Wagenknecht, T., Fleischer, S. Purification și caracterization of ryanodine receptor 3 from mammalian tissue. *J. Biol. Chem.* **273**, 16011-16020 (1998).
18. Murayama, T., Oba, T., Katayama, E., Oyamada, H., Oguchi, K., Kobayashi, M., Otsuka, K., Ogawa, Y. Further characterization of the type 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm. *J. Biol. Chem.* **274**, 17297-17308 (1999).
19. Murayama, T., Ogawa, Y. Characterization of type 3 ryanodine receptor (RyR3) of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscles. *J. Biol. Chem.* **272**, 24030-24037 (1997).
20. Baran, I., Ganea, C., Baran, V. A two-gate model for the ryanodine receptor cu allosteric modulation by caffeine și quercetin, *Eur. Biophys. J.* **37**, 793-806 (2008).
21. Zhao, F., Li, P., Chen, S. R., Louis, C. F., Fruen, B. R. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism și isoform selectivity. *J. Biol. Chem.* **276**, 13810-13816 (2001).
22. Vaithianathan, T., Narayanan, D., Asuncion-Chin, M. T., Jeyakumar, L. H., Liu, J., Fleischer, S., Jaggar, J. H., Dopico, A. M. Subtype identification și functional characterization of ryanodine receptors in rat cerebral artery myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C264-278 (2010).
23. Irina Baran and Constanta Ganea, RyR3 in situ regulation by Ca²⁺ and quercetin and the RyR3-mediated Ca²⁺ release flux in intact Jurkat cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, (acceptat)
24. Ganea C. ; Katona, E.; Baran, I., Quercetin activates the RyR3 receptor in Jurkat human leukemia cells, conferință invitată, Max Planck Institut for Biophysics, Frankfurt/Main, Germania, 24 oct. 2011
25. Baran, I.; Katona, E.; Ganea, C., Quercetin fluorescence reveals the open probability of the RyR3 Ca²⁺ channel in intact cells, 22nd IUBMB Congress/37th FEBS, Seville, SPAIN, SEP 04-09, 2012, *FEBS JOURNAL* Volume: 279 Special Issue: SI Suppl: 1, p: 269-270, SEP 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 flavonoizi (faza a II-a)

INTRODUCERE. Așa cum am arătat deja în prima fază a proiectului, epigallocatechina-3-galată (EGCG) și quercetina (QC) sunt doi flavonoizi bine investigați 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 cei doi flavonoizi, QC și EGCG, aplicați singuri 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 μ 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-alcalin (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].

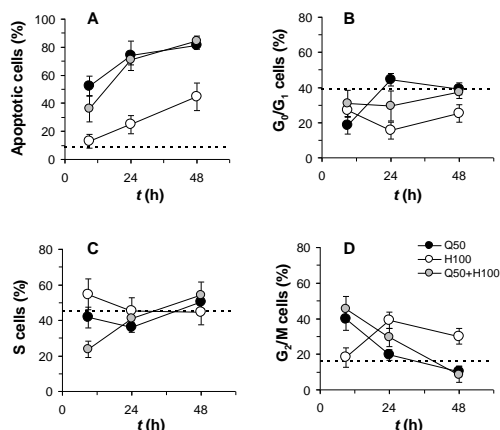
REZULTATE ȘI DISCUȚII

Efectele iradierii cu protoni, ale MD, H_2O_2 , 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 μ M 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 H_2O_2 . 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. Din măsurătorile cinetice se observă că quercetina poate opri celulele Jurkat în faza G_2/M (Fig. 1). Mai mult, fracția celulară G_2/M în cazul celulelor tratate cu 50 μ M QC timp de 24 h a scăzut de la $39.8 \pm 6.4\%$ la 9 h, la $10.3 \pm 3.0\%$ la 48 h după tratament (Fig. 1D). Blocarea G_2/M a fost asociată cu o reducere semnificativă a fracției celulare G_0/G_1 (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).

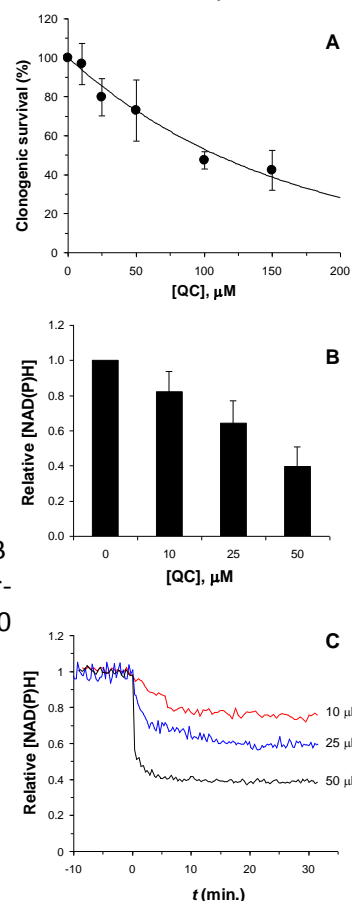
Fig. 1. Evoluția în timp a ratei apoptotice și a distribuției ciclului celular după tratamentul celulelor Jurkat cu 50 μM QC timp de 24 h (Q50, cercuri solide), 100 μM H_2O_2 timp de 20 min. (H100, cercuri deschise) sau cu o combinație a celor două (50 μM QC pre-incubare urmată de adăugarea a 100 μM H_2O_2 timp de 20 min.; tratamentul notat cu Q50 + H100, cercurile gri). Sunt indicate ratele apoptotice pentru fracțiile celulare (A), G_0/G_1 (B), faza S (C) și G_2/M (D). Linia punctată reprezintă media obținută pentru probele celulare control.



În tratamentele cu durata de 1 h, QC a descrescut supraviețuirea celulară într-o manieră exponențială, 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).

Fig. 2. Quercetina descreește 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 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 descrescut 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 .

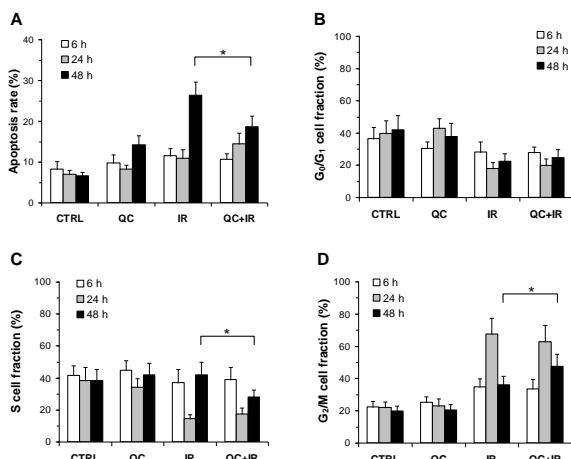


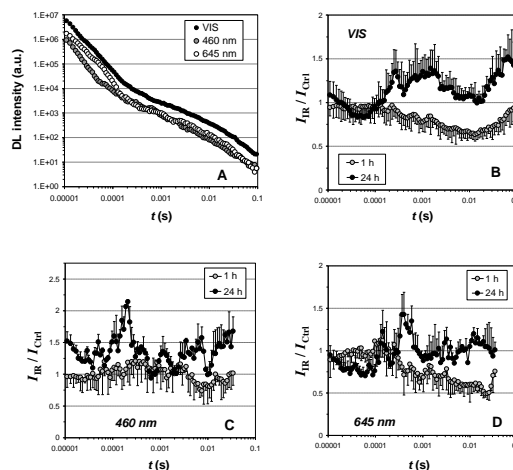
Fig. 3. Apoptoză și distribuțiile ciclului celular evaluate la 6, 24 și 48 h după tratamentul celulelor Jurkat cu vehiculul (Ctrl), cu 50 μM QC timp de 1 h (QC), cu 2 Gy de radiație de protoni (IR) sau cu 2 Gy radiație de protoni după preincubarea cu 50 μM QC timp de 1 h (QC + IR). (A) ratele apoptotice, (B) G_0/G_1 , (C) faza S și (D) fracția G_2/M . Cu steluță sunt notate diferențele semnificative dintre tratamentele cu IR și QC + IR.

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.

Efectele iradierii cu protoni, ale MD, H_2O_2 , QC și EGCG asupra luminescenței întârziată

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_R) 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 μ s (valoarea derivată din analiza de fitare nu este arătată, totuși un vârf distinct centrat pe cca. 180 μ s 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 descrescut 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 μ s (Fig. 4D, și alte date ale analizei). 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 μ M 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 fotoemisiei pe întreaga scară de timp.

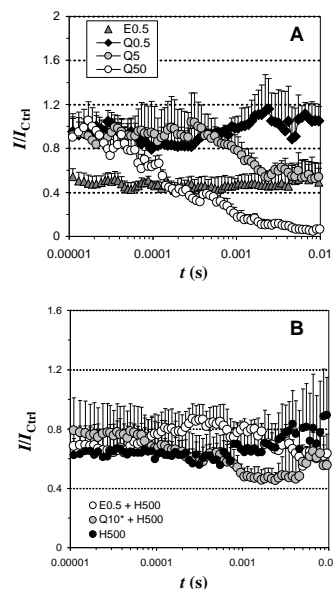
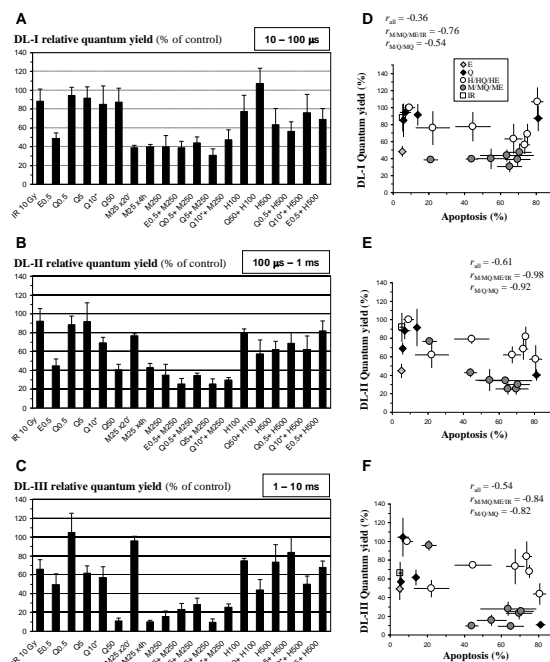


Fig. 5. Cinetica emisiei DL a celulelor Jurkat după diferite tratamente cu flavonoizi (A) ori cu H_2O_2 singur, ori în combinație cu EGCG ori QC (B). Tratamentele sunt marcate în figură. Intensitatea emisiei de lumină a celulelor tratate (I) este normalizată la intensitatea DL a celulelor control (I_{Ctrl})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

500 μ M 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 μ M EGCG timp de 24 h a fost capabil să inducă o revenire semnificativă a emisiei DL-II, în timp ce preincubarea cu 10 μ M QC timp de 1 h a redus încă mai mult intensitatea DL-III. O doză mai scăzută, de 100 μ M 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 μ M QC timp de 24 h a restaurat emisia 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 H₂O₂ 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 ($r_{M/MQ/ME/IR}$) și pentru tratamentele M/Q/MQ ($r_{M/Q/MQ}$). 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 ± 6.1% din valoarea sa de repaus (Fig. 6C). Preincubarea cu cei doi flavonoizi 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 ± 3.8%.

În momentul de față, efectele QC sau ale EGCG asupra apoptozei induse în celulele Jurkat de către flavonoizii înșiși în conjuncție cu MD 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 menadionii prin amplificarea apoptozei induse de acești compuși în celulele Jurkat T de leucemie umană. În acord cu raportări 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 H₂O₂ și a indus oprirea ciclului celular G₂/M, permițând astfel un timp pentru repararea leziunii induse de H₂O₂. 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 membranelor mitocondriale. Similar cu efectul protector al QC față de H₂O₂ 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.

Date suplimentare se găsesc în raportul *in extenso* și în articolul publicat.

Rezultatele acestui studiu au fost publicate în revista ISI *Oxidative Medicine și Cellular Longevity* [8].

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE SELECTIVE

1. 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.
2. H. Nakagawa, K. Hasumi, J. T. Woo, K. Nagai, și 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.
3. S. Matzno, Y. Yamaguchi, T. Akiyoshi, T. Nakabayashi, și K. Matsuyama, „An attempt to evaluate the effect of vitamin K3 using as an enhancer of anticancer agents”, *Biological și Pharmaceutical Bulletin*, vol. 31, pp. 1270-1273, 2008.
4. D. Chen, K. G. Daniel, M. S. Chen, D. J. Kuhn, K. R. Landis-Piwowar, și Q. P. Dou, „Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells”, *Biochemical Pharmacology*, vol. 69, pp. 1421-1432, 2005.
5. J. H. Jeong, J. Y. An, Y. T. Kwon, J. G. Rhee, și 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.
6. G. C. Yen, P. D. Duh, H. L. Tsai, și S. L. Huang, "Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 67, pp. 1215-1222, 2003.
7. 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 și Biophysics*, vol. 58, pp. 169-179, 2010.
8. Baran, Irina; Ganea, Constanta; et al., Detailed Analysis of Apoptosis and Delayed Luminescence of Human Leukemia Jurkat T Cells after Proton Irradiation and Treatments cu Oxidant Agents and Flavonoids, *OXIDATIVE MEDICINE and CELLULAR LONGEVITY* Article Number: 498914 DOI: 10.1155/2012/498914 Published: 2012
9. S. Tudisco, A. Scordino, G. Privitera, I. Baran, și F. Musumeci, "ARETUSA – advanced research equipment for fast ultraweak luminescence analysis: new developments", *Nuclear Instruments și Methods in Physics Research Section A*, vol. 518, pp. 463-464, 2004.
10. I. Baran, C. Ganea, A. Scordino et al., "Apoptosis, cell cycle și 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.
11. L. C. Wilms, J. C. Kleinjans, E. J. Moonen, și 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.
12. M. L. Verkhovskaya, N. Belevich, L. Euro, M. Wikström, și 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.
13. M. A. Ortner, B. Ebert, E. Hein et al., "Time gated fluorescence spectroscopy in Barrett's oesophagus", *Gut*, vol. 52, pp. 28-33, 2003.
14. 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 și Photobiology. B, Biology*, vol. 79, pp. 93-99, 2005.
15. H. W. Kim, S. B. Sim, C. K. Kim, J. Kim, C. Choi, H. You, și 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.
16. W. Kemmner, 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.

Evaluarea efectelor quercetinei asupra viabilității celulare și metabolismului mitocondrial în limfoblaști Jurkat (faza a III-a)

INTRODUCERE. În acest studiu, am evaluat efectele in vitro ale tratamentelor celulelor Jurkat cu quercetină, menadionă (MD) sau cu o combinație a celor două. În baza abilității quercetinei de a manifesta un caracter dual, anti- ori pro-oxidant, depinzând de condițiile de dozare și tratamente [1], ca și a celei de activa sau inhiba mPTP (mitochondrial permeability transition pore - porul tranziției de permeabilitate mitocondrială)[2], ne-am propus să verificăm dacă efectul antiproliferativ al quercetinei și capacitatea acesteia de a amplifica moartea celulară indusă de MD în celulele Jurkat pot fi mediate de către o producție crescută de specii de oxigen reactiv (ROS) și/sau printr-o disfuncție mitocondrială determinată de colapsul $\Delta\psi_m$. Am investigat supraviețuirea clonogenică, nivelul de superoxid mitocondrial și conținutul celular de H_2O_2 , ca și starea de polarizare mitocondrială. În unele dintre experimente ne-am referit la efectele rotenonului (ROT), un inhibitor larg utilizat al Complexului I respirator, primul component al lanțului mitocondrial de transfer de electroni. Atât menadionă cât și rotenonul pot produce mari cantități de anion superoxid ($O_2^{\cdot-}$) [3-5], care este apoi dismutat rapid la peroxid de hidrogen (apă oxigenată)(H_2O_2) de către superoxid dismutazele citosolice sau mitocondriale. Rezultatele pe care le-am obținut în acest studiu indică faptul că tratamentele acute (1 h) cu QC exercită un efect antiproliferativ semnificativ, dependent de doză, în celulele Jurkat, efect care este acompaniat de o considerabilă reducere a nivelurilor de ROS, și sprijină ideea conform căreia eliberarea de calciu este un pas timpuriu și critic în inducerea morții celulare de către QC, pas urmat de o

pierdere (dispariție) tranzitorie a $\Delta\psi_m$. Totuși, variațiile mari ale $\Delta\psi_m$ (comutarea de la depolarizare completă la o hiperpolarizare considerabilă) observate după ≥ 30 min. de la îndepărtarea agentului medicamentos au fost insensibile la inhibarea eliberării de Ca^{2+} indusă de QC. Aceste observații sugerează că, în condițiile noastre, evenimentele cruciale care au declanșat angajarea în moarte celulară (apoptoză) s-au produs în timpul și nu după o oră de expunere la quercetină. În plus, datele obținute indică faptul că tratamentele bazate pe o combinație de quercetină și menadionă pot fi mai eficiente în descreșterea supraviețuirii clonogene a celulelor Jurkat decât tratamentele în regim separat, încurajând astfel studiile ulterioare de caracterizare a quercetinei ca potențial agent chemoterapeutic care ar putea fi utilizat în tratamentul leucemiei.

MATERIALE ȘI METODE

Culturi celulare. Limfoblastii de celule leucemice umane Jurkat T (clona E6.1 de la ECACC) au fost cultivate în suspensie în mediu RPMI 1640 (Invitrogen 72400-021) conținând Glutamax-I și 25 mM HEPES, suplimentat cu 10% ser bovin fetal și, 100 unități/ml penicilină și 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycină, la 37°C într-un incubator umidificat cu atmosferă de 5% CO_2 . Densitatea, viabilitatea și morfologia celulară au fost examinate cu un microscop cu contrast de fază. Viabilitatea a fost evaluată cu testul de excludere albastru tripan. Pentru prepararea soluțiilor stoc, bisulfitul de sodiu de menadionă a fost dizolvat în tampon fosfat salin (PBS), iar dihidratul de quercetină, rotenonul și sarea de sodiu a dantrolenului au fost dizolvate în dimetil sulfoxid (DMSO). Indicatorii fluorescenți, JC-1, MitoSOX Red și $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$ (Invitrogen), au fost dizolvați în DMSO. Dacă nu se specifică altfel, toate chimicalele au fost cumpărate de la Sigma-Aldrich. În experimentele implicând înregistrări de lungă durată s-a folosit o soluție salină standard (SS, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 20 mM HEPES, 10 mM glucoză, pH 7.2/NaOH). **Evaluarea supraviețuirii clonogene.** După tratament, celulele au fost spălate cu PBS cald și cultivate în 96 de godeuri la o densitate de 3 ori 6 celule/godeu în 100 μl de mediu complet per godeu. După 3-4 săptămâni de incubare, au fost numărate la microscopul în contrast de fază godeurile în care existau colonii cu >50 celule. Eficiența de cultivare a fost calculată ca fiind $\ln[96/(\text{nr. de godeuri negative})]/(\text{densitate celulară}) \times 100$. Supraviețuirea celulară a fost determinată ca raportul dintre eficiența de cultivare a celulelor tratate și, respectiv, netratate. **Spectrofluorimetrie.** Suspensii celulare (1.5 ml) cu o densitate de $\approx 10^6$ celule/ml au fost măsurate într-o cuvă de cuarț menținută la 37°C sub agitare continuă într-un spectrofluorimetru Horiba Jobin Yvon. Polarizarea mitocondrială și NADH au fost întotdeauna evaluate în aceleași probe celulare. Pentru determinarea stării de polarizare mitocondrială, celulele au fost incubate cu JC-1 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) timp de 20 min. în mediu complet la 37°C, apoi au fost spălate de două ori cu PBS și resuspendate în PBS și transferate imediat în spectrofluorimetru. Spectrele de emisie au fost colectate în triplicat, cu excitare la 490 nm. Gradul de polarizare mitocondrială a fost evaluat ca raportul F_{594}/F_{534} dintre fluorescența JC-1 la 594 nm și cea la 534 nm, și a fost apoi normalizat la raportul F_{594}/F_{534} pentru celulele control ($12.3 \pm 1.5\%$) ($n = 21$). Pentru a determina nivelul mitocondrial de NADH, spectrele de emisie la 450 nm au fost colectate în triplicat, cu excitare la 340 nm. Pentru evaluarea modificărilor nivelului mitocondrial de superoxid, celulele netratate au fost spălate de două ori cu SS caldă, incubate 15 min. la 37°C cu indicatorul specific MitoSOX Red (5 μM) în SS, spălate o dată cu SS caldă, resuspendate în SS și transferate imediat în spectrofluorimetru. Fluorescența a fost înregistrată în mod cinetic, cu excitare la 380 nm și emisie la 580 nm. Pulsurile de excitare au fost repetate la fiecare 22 s. La momentele de timp indicate s-a adăugat direct în cuvă QC sau ROT, respectiv, fără a întrerupe înregistrarea. Pentru a evalua variațiile conținutului celular de H_2O_2 , celulele au fost spălate cu PBS cald, colectate prin centrifugare și supernatantul a fost înlăturat. Celulele au fost apoi resuspendate în PBS cald conținând 0.5 μM $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$, incubate timp de 10 min. la 37°C, spălate ca mai înainte, apoi resuspendate în SS caldă, incubate încă 10 min. și transferate apoi în spectrofluorimetru. Spectrele de emisie au fost colectate în triplicat, cu excitare la 490 nm. Conținutul celular de H_2O_2 a fost cuantificat pe baza fluorescenței emise de $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$ la 522 nm. Pulsurile de excitare au fost repetate la fiecare 20 s. La momentele de timp indicate s-a adăugat direct în cuvă QC sau MD, respectiv, fără a întrerupe înregistrarea. 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. Alte detalii în raportul *in extenso* și în publicația rezultată în urma acestui studiu.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Efectele QC, MD și ale combinațiilor acestora asupra supraviețuirii clonogene

Quercetina a descreșcut supraviețuirea clonogenă a celulelor Jurkat într-o manieră dependentă de doză (Fig. 1A). Doza caracteristică de quercetină, aplicată timp de o oră, ($D_{50\%}$) necesară pentru a descrește supraviețuirea clonogenă la 50% a fost estimată a fi 107.4 μM . Deoarece, în lucrări anterioare [6, 7], am găsit că QC induce în celulele Jurkat un semnal de eliberare de Ca^{2+} puternic și susținut, semnal mediat prin activarea receptorului rianodinic de tip 3 (RyR3) [7], am investigat în acest studiu și implicarea eliberării de calciu în apoptoza indusă de QC în acest sistem celular. În acest scop, am utilizat dantrolenul (20 μM), un inhibitor al RyR3, care a fost aplicat timp de 15 min. înaintea adăugării quercetinei pentru 1 h. Rezultatele arătate în Fig. 1A indică clar că dantrolenul, care

reduce consistent creșterea de Ca^{2+} citosolic declanșată de către quercetină în celulele Jurkat [7], are un efect protector față de inducerea apoptozei. Astfel, doza caracteristică necesară pentru scăderea clonogenității de către quercetină la 50% în celulele Jurkat tratate cu dantrolen ($282.9 \mu\text{M}$) a fost substanțial mai mare decât doza indicată mai sus în absența dantrolenului.

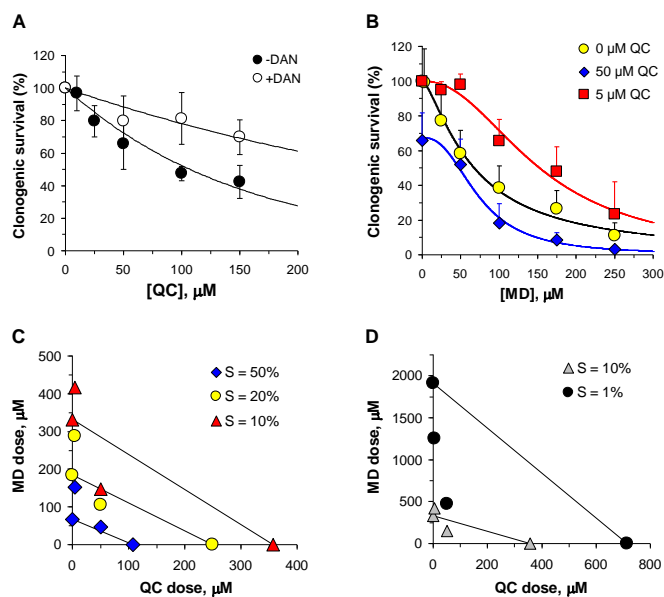


Fig. 1. Quercetina și menadiona scad supraviețuirea clonogenă a celulelor Jurkat într-o manieră dependentă de doză. **(A)** Quercetina a fost aplicată timp de 1 h în absența (-DAN) ori în prezența (+DAN) a $20 \mu\text{M}$ dantrolen, care a fost adăugat cu 15 min. înainte de quercetină. Datele au fost fitate cu o funcție exponențială (curbele) și a produs dozele caracteristice $D_{50\%}$ de $107.4 \mu\text{M}$ și $282.9 \mu\text{M}$, respectiv. **(B)** Menadiona a fost aplicată timp de 20 min. în absența sau în prezența quercetinei, adăugată cu 1 h înainte de menadionă la dozele indicate. Datele au fost fitate cu ecuația $y = y_0 K_d^H / (x^H + K_d^H)$ cu $y_0 = 100$ pentru 0 și $5 \mu\text{M}$ QC, și $y_0 = 67.4$ pentru $50 \mu\text{M}$ QC. Valorile K_d și H sunt date în Tabelul 1. **(C)-(D)** Diagramele isobolograme construite pentru combinațiile QC-MD la diferite intensități ale efectului corespunzând valorilor indicate ale supraviețuirii clonogene (S). Toate punctele datelor au fost derivate utilizând datele din fitarea curbelor prezentate în panelul B. Indicii de combinare sunt dați în Tabelul 2.

Menadiona aplicată timp de 20 min. a descrescut, de asemenea, într-o manieră dependentă de doză, supraviețuirea clonogenă a celulelor Jurkat, cu un K_d aparent, $K_d = 66.8 \mu\text{M}$ și un coeficient Hill, $H = 1.37$ (Fig. 1B), sugerând o interacțiune cooperativă probabil a două locuri de legare ale MD la o macromoleculă specifică. Este interesant faptul că QC a manifestat în combinație cu menadiona un efect dual. Astfel, la doză scăzută ($5 \mu\text{M}$) QC a exercitat un efect protector față de moartea celulară indusă de MD cu efecte moderate (supraviețuire clonogenă $\sim 10\text{-}50\%$), în timp ce la doze mari ($50 \mu\text{M}$) QC a accentuat semnificativ moartea celulară indusă de MD cu niveluri înalte ale efectelor (supraviețuirea clonogenă $\leq 20\%$) (Fig. 1B).

Tabel 1. Parametrii de legare a menadionei derivați din datele de supraviețuire clonogenă.

Parametru	[QC], μM		
	0	5	50
K_d (μM)	66.8	151.8	72.7
H	1.37	2.17	2.45

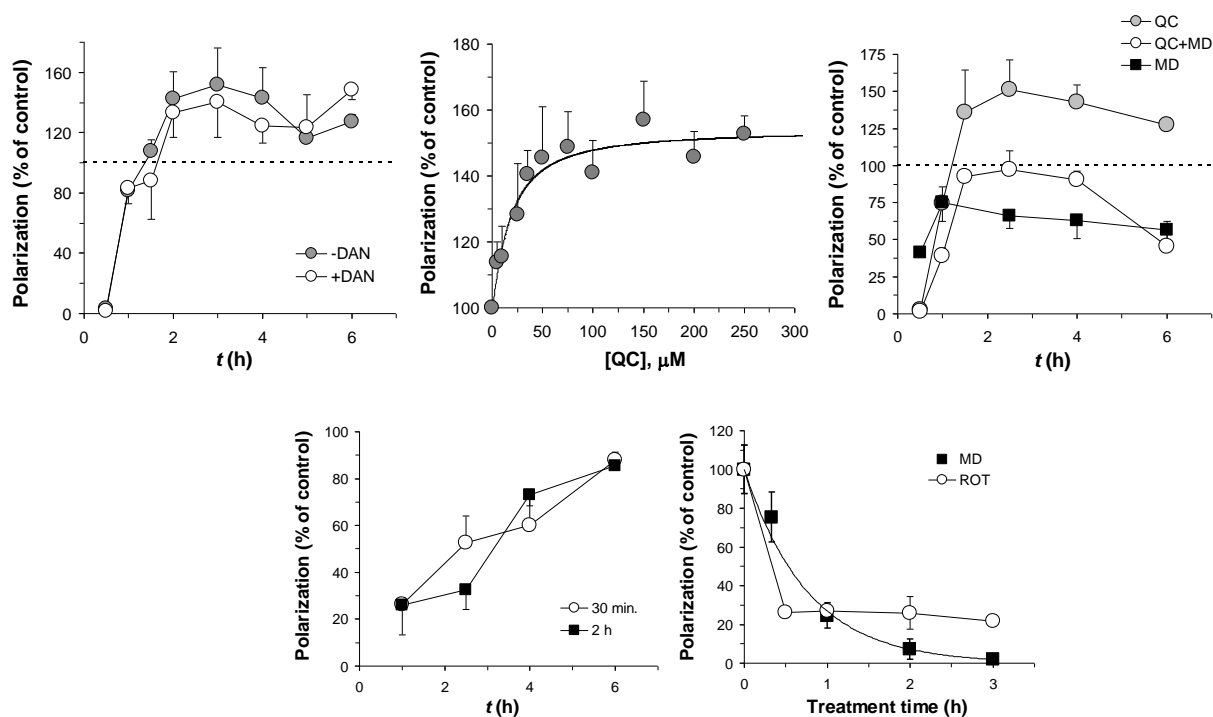


Fig. 2. Efectele QC, MD și ROT asupra $\Delta\psi_m$ în celulele Jurkat. **(A)** Variațiile cinetice ale $\Delta\psi_m$, exprimate ca grade de polarizare relative la control, au fost monitorizate după tratamente cu 150 μM QC timp de 1 h ca funcție de timpul scurs de la îndepărtarea QC. Rezultatele obținute în absența (-DAN) sau prezența (+DAN) a 20 μM dantrolen, adăugat cu 15 min. înainte a quercetinei, au fost foarte asemănătoare. **(B)** Starea de polarizare mitocondrială (relativă la control) evaluată la 3 h după expunere de o oră la QC a fost determinată în funcție de doza de quercetină. Datele au fost fitate cu funcția $P (\%) = 100 + (P_{\max} - 100) [\text{QC}]^h / ([\text{QC}]^h + K_d^h)$, unde P reprezintă gradul relativ de polarizare, K_d constanta de disociere a QC, și h coeficientul Hill. Cel mai bun fit (curba) a fost obținut cu $P_{\max} = 157.0$, $K_d = 7.05 \mu\text{M}$ și $h = 0.85$. **(C)** Variațiile cinetice ale $\Delta\psi_m$ induse de tratamente cu 150 μM QC timp de 1 h (QC), 250 μM MD timp de 20 min. (MD) ori combinații ale celor doi agenți adăugați consecutiv (QC+MD), ca funcție de timp scurs după înlăturarea agentului. Linia punctată reprezintă nivelul de 100% corespunzând celulelor control. În **(A)** și **(C)**, primele puncte ale datelor au fost obținute prin încărcarea cu JC-1 în decursul ultimelor 20 min. ale tratamentului. **(D)** Revenirea din depolarizarea mitocondrială urmând tratamente cu 250 μM ROT timp de 30 min. și 2 h, respectiv. **(E)** Depolarizarea mitocondrială evaluată la 1 h după înlăturarea agentului ca funcție de timpul de tratament. Celulele au fost tratate cu 250 μM MD ori 250 μM ROT, respectiv, spălate și încărcate imediat cu JC-1 așa cum s-a descris în Materiale și Metode.

Tabel 2. Indicii de combinare în combinațiile MD cu 5 μM ori 50 μM QC. Parantezele indică sinergia (+) ori antagonismul (-). Este indicat efectul biologic (supraviețuirea clonogenă, S) pentru care a fost calculat indicele de combinare.

Efect	5 μM QC	50 μM QC
S = 50%	2.32 (-)	1.17 (-)
S = 20%	1.58 (-)	0.77 (+)
S = 10%	1.27 (-)	0.59 (+)
S = 1%	0.66 (+)	0.32 (+)

Indiferent de doză, quercetina modifică coeficientul Hill aparent al menadionii (Tabel 1), sugerând o interacțiune alosterică între QC și MD. Astfel, în prezența quercetinei, este posibil ca trei molecule de menadionă să interacționeze cooperativ cu o macromoleculă specifică pentru a declanșa semnalul de moarte celulară în limfoblaștii

Jurkat, în timp ce, în absența flavonoidului, pentru a induce moartea celulară, sunt necesare două molecule de menadionă pentru a lega cooperativ respectiva țintă moleculară. Mai mult, isoblograma și analiza indicelui de corelare [8] indică că la niveluri scăzute și medii ale efectelor (supraviețuire clonogenă $10\% \leq S \leq 50\%$) quercetina la doze scăzute sau înalte poate manifesta un efect diferențial antagonist sau sinergic, respectiv, în combinație cu menadiona (Fig. 1C, Tabel 2). Cu toate acestea, la niveluri ridicate ale efectelor ($S \leq 1\%$), care sunt relevante pentru terapie, există o sinergie semnificativă atât la doze mari cât și la doze mici de quercetină. Deci, pare că, la o dozare corespunzătoare, un tratament combinat quercetină-menadionă poate fi mai eficient în reducerea clonogenității decât un tratament cu menadiona singură.

Efectele QC, MD și ROT asupra $\Delta\psi_m$

Quercetina (150 μM) aplicată timp de 1 h a produs un tablou cinetic complex al depolarizării mitocondriale în prima oră după înlăturarea substanței, urmat de o fază consistentă de hiperpolarizare care a început la 2 ore după înlăturarea QC și care a persistat cel puțin 4 ore (Fig. 2A). Pre-tratamentul cu dantrolen nu a avut un efect semnificativ asupra gradului de polarizare mitocondrială (Fig. 2A), sugerând faptul că nu încărcarea mitocondrială cu Ca^{2+} ar fi cauza primară a variațiilor observate ale potențialului membranei mitocondriale. Am evaluat gradul de polarizare în momentul hiperpolarizării maxime (2.5 h după înlăturarea flavonoidului) ca funcție de concentrația quercetinei. Rezultatele (Fig. 2B) indică faptul că QC se leagă la o țintă moleculară, aflată probabil în interiorul mitocondrii, inducând hiperpolarizarea membranei interne, cu o constantă de disociere estimată (K_d) de 7.05 μM și un coeficient Hill de 0.85. Rezultatele prezentate până acum sugerează că, cel mai probabil, starea de hiperpolarizare a mitocondrii nu este implicată în moartea celulară (apoptotică) indusă de quercetină în celulele Jurkat, deoarece doza caracteristică $D_{50\%}$ este mult mai ridicată decât K_d , și, în plus, efectele dantrolenului asupra supraviețuirii clonogene sau a hiperpolarizării mitocondriale diferă semnificativ.

În continuare am comparat efectele QC, MD și cele ale combinației celor două asupra variațiilor $\Delta\psi_m$. Quercetina (50 μM) aplicată timp de 1 h a produs un tablou similar celui descris mai sus, pe când menadiona aplicată timp de 20 min. a avut un efect de depolarizare bifazic (Fig. 2C). Astfel, după o stare inițială de depolarizare puternică observată la 30 min. după înlăturarea MD, s-a produs o revenire parțială în următoarele 30 min., urmată de o depolarizare gradată înregistrată în următoarele 5 ore (Fig. 2C). Combinația celor doi agenți a produs un efect intermediar, cu o depolarizare extensivă în prima oră după spălare, cu o recuperare subsecventă a stării de repaus în următoarele 3 h, și în final cu o depolarizare considerabilă observată la 6 h după înlăturarea substanțelor medicamentoase (Fig. 2C).

Pentru a evalua semnificația măsurărilor noastre utilizând indicatorul pentru $\Delta\psi_m$, JC-1, am folosit și inhibitorul lanțului respirator mitocondrial, rotenonul. Expunerea celulelor Jurkat la 250 μM rotenon timp de 30 min. a produs o supraviețuire clonogenă a celulelor de $27.8 \pm 7.5\%$ ($n = 5$). Am evaluat, de asemenea, prin citometrie în flux că rotenonul (250 μM) a indus o fracție celulară apoptotică timpurie de $23 \pm 8\%$ ($n = 4$) și o fracție celulară apoptotică /necrotică târzie de $56 \pm 7\%$ ($n = 4$) la 48 h după tratament, indicând o progresie lentă a procesului apoptotic indus de ROT în aceste celule. ROT a produs, de asemenea, o depolarizare mitocondrială extinsă în 1 h de la tratament și care apoi a avut o revenire progresivă în următoarele 5 h (Fig. 2D). Gradul și cinetica de revenire au fost foarte asemănătoare pentru tratamentele de fie 30 min. ori 2 h (Fig. 2D). Mai mult, gradul de depolarizare mitocondrială evaluat la 1 h după înlăturarea substanței a fost virtual identic pentru durate ale tratamentelor de 30 min., 1 h, 2 h ori 3 h (Fig. 2E). Consistent cu aceasta, apoptoza a fost similară pentru tratamentele de fie 30 min. fie 1 h. Împreună, aceste rezultate sugerează că efectele ROT asupra inducerii apoptozei și a depolarizării mitocondriale sunt complete pentru o expunere de 30 min., ceea ce este în foarte bună concordanță cu raportări anterioare conform cărora rotenonul colapsează $\Delta\psi_m$ și induce deschiderea mPTP în 20 min. [9]. Rezultatele noastre indică, de asemenea, că în condițiile noastre pierderea $\Delta\psi_m$ indusă de ROT este reversibilă, și că restabilirea $\Delta\psi_m$ observată după îndepărtarea ROT ar putea să reflecte slăbirea gradată a legării rotenonului la Complexul I, care s-a dovedit a fi stabilă, deci să persiste mult timp după spălare [10].

S-a arătat că atât quercetina cât și menadiona scad nivelul NADH în celulele Jurkat [6, 7, 11] sugerând faptul că în condițiile noastre ambii agenți au stimulat activitatea Complexului I respirator (manuscris trimis [12]). În absența altor mecanisme adiționale, acest lucru ar induce hiperpolarizarea mitocondriei. În consecință, rezultatele noastre ar putea indica faptul că dispariția timpurie a $\Delta\psi_m$ evocată de către quercetină ar fi o consecință a deschiderii porului mPTP. În celulele tratate cu QC, acest eveniment pare a fi ranversat în 2 h de la îndepărtarea flavonoidului, sugerând faptul că porii mPTP revin la starea lor de repaus închisă, în timp ce rata de respirație accelerată duce la instalarea stării observate de hiperpolarizare pe calea unei viteze crescute de pompă protonică prin lanțul de transfer de electroni. Se poate deci considera că cele două doze specifice pe care le-am găsit și anume 107 μM și 7 μM , caracterizează legarea quercetinei la mPTP și la Complexul I mitocondrial, respectiv. În plus, s-a găsit că QC se acumulează în mari concentrații în mitocondrii, și s-a observat în celulele Jurkat o redistribuire lentă în citosol după înlăturarea flavonoidului din mediul extracelular [13]. În consecință, este posibil ca QC să fie reținută în interiorul mitocondriei într-o formă legată, în cantități suficiente pentru a susține starea de hiperpolarizare pe termen lung observată aici. Efectul diferit al menadionei asupra $\Delta\psi_m$, coroborat cu efectul MD de reducere a nivelului de NAD(P)H, sugerează o deschidere gradată, pe termen lung, a mPTP în urma îndepărtării MD. Tratamentele cu menadionă pe o durată de timp crescută au dus la pierderea progresivă a $\Delta\psi_m$, fapt care a putut fi foarte bine fitat cu o funcție exponențială (Fig. 2E). Rezultatele arată că expunerea la 250 μM MD timp de 3 h a dus la abolirea aproape completă a $\Delta\psi_m$, și că în prezența a 250 μM MD un eveniment de depolarizare a mitocondriei se produce după un timp mediu de 45.7 min..

Hiperpolarizarea indusă de QC este inhibată de către inhibitorii respirației

Pentru a întări ideea conform căreia hiperpolarizarea mitocondrială indusă de QC își are originea în stimularea Complexului I, am folosit inhibitorul specific al Complexului I, rotenonul, care a fost adăugat celulelor Jurkat tratate cu QC la momentul hiperpolarizării mitocondriale maxime atinsă după îndepărtarea quercetinei. În urma acestui tratament, gradul de polarizare a scăzut în mod dependent de doză în două faze distincte (Fig. 3A), sugerând faptul că ROT se leagă la două clase de locuri de legare, cu parametrii indicați în Tabelul 3.

Tabel 3. Parametrii de legare a rotenonului derivați din măsurătorile spectrofluorimetrice.

Parametru	Cantitatea măsurată	
	$\Delta\psi_m$ *	$[\text{NADH}]_m$ **
w_1	0.42	0.33
K_{d1} (μM)	3.68	3.58
$H1$	1.22	1.35
w_2	0.58	0.67
K_{d2} (μM)	215.2	164.1
$H2$	2.81	3.57

* Datele prezentate în Fig. 3A

** Datele prezentate în Fig. 3B

Nivelul mitocondrial al NADH, care este substratul specific al Complexului I, a crescut, de asemenea, în două faze la creșterea dozei de ROT (Fig. 3B, Tabel 3), astfel încât, în aceste condiții, s-a obținut o anticorelație foarte puternică între gradul de polarizare mitocondrială și $[\text{NADH}]_m$ (Fig. 3C), sugerând o legătură directă între starea de hiperpolarizare a mitocondriei indusă de QC și activitatea Complexului I.

Tabel 4. Parametrii de legare ai antimicinei A din măsurătorile spectrofluorimetrice.

Parametru	Cantitatea măsurată	
	$\Delta\psi_m^*$	$[\text{NADH}]_m^{**}$
K_d (μM)	16.2	79.3
H	1.23	1.66

* Datele prezentate în Fig. 3D

** Datele prezentate în Fig. 3E

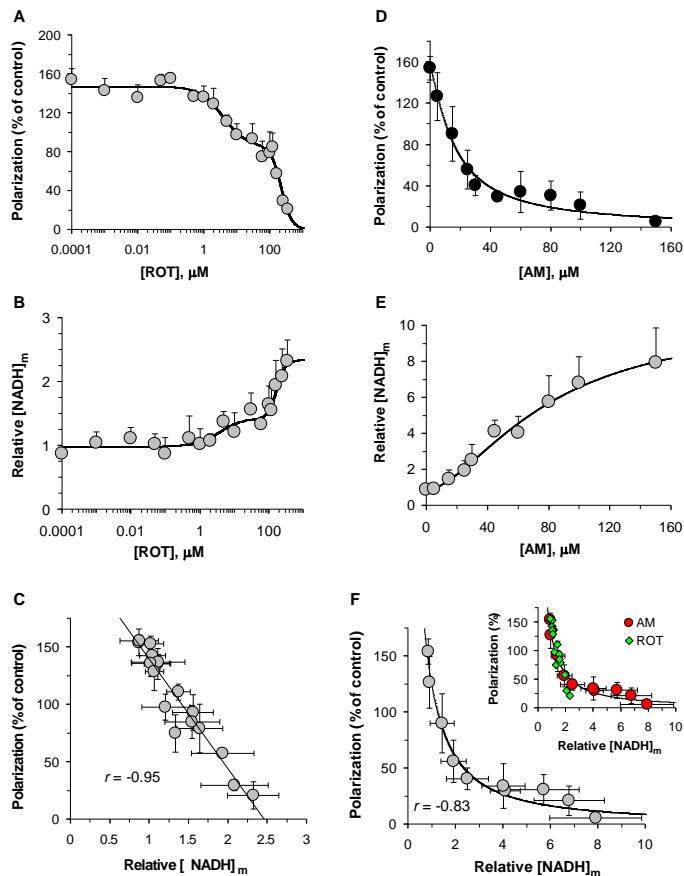


Fig. 3. Hiperpolarizarea mitocondrială indusă de QC este inhibată de ROT (A-C) și AM (D-F). Gradul de polarizare (relativ la control) ca funcție de doză de ROT (A) ori AM (D). Datele au fost fitate cu ecuația (A) $y = y_0 [w_1 K_{d1}^{H1} / (x^{H1} + K_{d1}^{H1}) + w_2 K_{d2}^{H2} / (x^{H2} + K_{d2}^{H2})]$ cu $y_0 = 147.0$, ori (D) $y = y_0 K_d^H / (x^H + K_d^H)$ cu $y_0 = 155.2$; alte valori ale parametrilor sunt date în Tabelul 3 și Tabelul 4, respectiv. Nivelul mitocondrial de NADH (relativ la control) ca funcție de doză de ROT (B) ori AM (E). Datele au fost fitate cu ecuația (B) $y = y_0 + (y_m - y_0) [w_1 x^{H1} / (x^{H1} + K_{d1}^{H1}) + w_2 x^{H2} / (x^{H2} + K_{d2}^{H2})]$ cu $y_0 = 0.98$ și $y_m = 2.33$, ori (D) $y = y_0 + (y_m - y_0) x^H / (x^H + K_d^H)$ cu $y_0 = 0.85$ și $y_m = 9.61$; alte valori ale parametrilor sunt date în Tabelul 3 și Tabelul 4, respectiv. Anticorelația puternică între $\Delta\psi_m$ și $[\text{NADH}]_m$ în celulele tratate cu (C) ROT-, ori (F) AM. Este indicat coeficientul de corelație Pearson (r). Punctele datelor au fost fitate cu o ecuație lineară (C) sau cu o ecuație de tip Hill nonlineară (F). În panelul F - inset, punctele datelor prezentate în panelul C au fost suprapuse pe graficul obținut în panelul F.

Inhibitorul Complexului III, antimicina A, a inhibat de asemenea, în funcție de doză, hiperpolarizarea mitocondrială indusă de QC (Fig. 3D). Totuși, această inhibiție apare ca fiind monofazică (Fig. 3D, Table 4), sugerând că în acest proces este implicată o singură clasă de locuri de legare ale AM. Această idee este sprijinită și de dependența $[\text{NADH}]_m$ de doză de AM (Fig. 3E), ceea ce a dus la o anticorelație puternică între gradul de polarizare mitocondrială și $[\text{NADH}]_m$ (Fig. 3F). Mai mult, suprapunerea notabilă a celor două curbe obținute cu cei doi inhibitori, ai Complexului I și Complexului III, care poate fi ușor observată într-un anumit domeniu (Fig. 3F, inset), reflectă cel mai

probabil efectul inhibiției Complexului I, deoarece inhibiția Complexului III are ca rezultat inhibiția întregului lanț respirator. Ca o consecință a contribuției diferitelor complexe respiratorii la efectul global, dependența gradului de polarizare mitocondrială de $[NADH]_m$ în celulele tratate cu AM deviază de la linearitate la niveluri înalte de NADH (Fig. 3F). Acest lucru ar trebui să fie privit, de asemenea, în relație cu faptul că NADH este substratul specific al Complexului I, și nu al Complexului III. Luate împreună, toate aceste rezultate sugerează că hiperpolarizarea mitocondrială indusă de QC este datorată stimulării activității Complexului I.

Efectele QC, MD și ROT asupra producerii ROS

Pentru că efectul antiproliferativ al quercetinei este legat de o producere crescută de ROS, am folosit doi indicatori fluorescenți ai ROS, MitoSOX Red și CM-H₂DCFDA, pentru a monitoriza variațiile nivelului mitocondrial de superoxid și conținutul celular de H₂O₂, respectiv. Aceste investigații au relevat faptul că quercetina aplicată timp de 1 h manifestă un puternic caracter antioxidant în celulele Jurkat. Astfel, fluorescența MitoSOX Red a scăzut imediat după adăugarea a 50 μM QC la un nivel relativ staționar de o treime din fluorescența de repaus (Fig. 4A). Această reducere poate fi observată un timp îndelungat (≈80 min.), și a fost urmată de o fază de revenire bine definită (Fig. 4A), probabil reflectând activarea unor mecanisme antioxidante endogene. Pentru a testa fiabilitatea procedurii noastre experimentale, am investigat, de asemenea, efectul rotenonului asupra fluorescenței MitoSOX Red. Este bine cunoscut faptul că ROT produce mari cantități de superoxid în interiorul mitocondrii pe calea inhibiției Complexului I respirator [5]. Într-adevăr, măsurătorile noastre fluorimetrice au arătat că în 45-60 min. de la adăugarea a 50 μM ROT s-a produs o creștere de 6 ori a fluorescenței MitoSOX Red, care a fost apoi urmată de o fază de scădere staționară și abruptă (Fig. 4B), sugerând, ca și mai înainte, că sunt activate niște mecanisme antioxidante endogene.

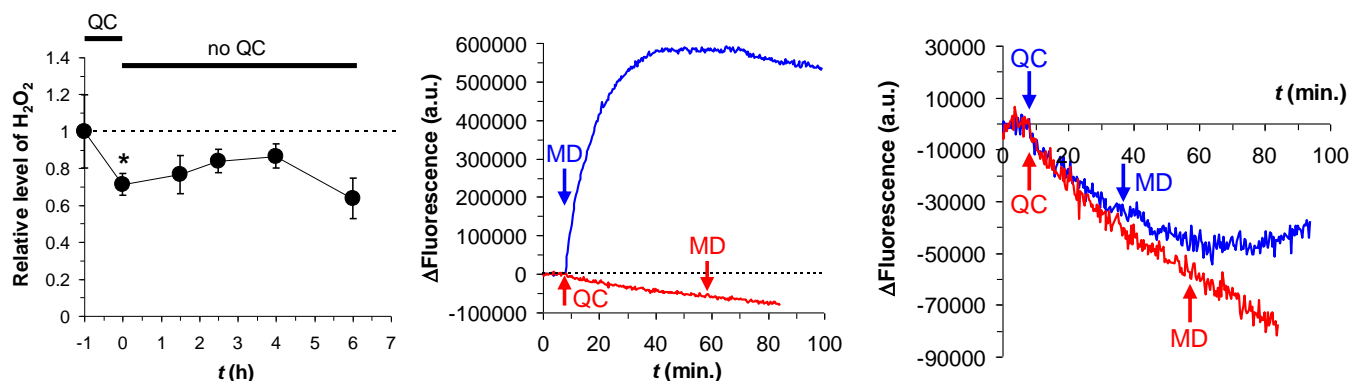


Fig. 4. Efectele QC, MD și ROT asupra producției de ROS celular. QC descrește (A), în timp ce ROT crește (B) nivelul mitocondrial de superoxid. O înregistrare fluorimetrică reprezentativă a fluorescenței MitoSOX Red înainte și după adăugarea de 50 μM QC (A) ori 50 μM ROT (B) este ilustrată. (C) Conținutul celular de H₂O₂, cuantificat prin fluorescența CM-H₂DCFDA relativ la control, descrește după tratamentul cu 50 μM QC timp de 1 h. Măsurătoarea la sfârșitul tratamentului (marcată cu un asterisc) a fost obținută din înregistrările cinetice cum este cea arătată în panelul D. (D) Variația absolută a fluorescenței CM-H₂DCFDA relativ la celulele control, în expuneri la 250 μM MD singură (traseul albastru) ori la adăugarea secvențială a 50 μM QC și 250 μM MD (traseul roșu) la punctele de timp indicate. (E) Variația fluorescenței CM-H₂DCFDA relativ la celulele control după adăugarea secvențială a 50 μM QC și 250 μM MD la punctele de timp indicate.

Luate împreună, toate aceste rezultate pledează împotriva posibilității ca scăderea fluorescenței MitoSOX Red indusă de QC să fie datorată dispersiei indicatorului din mitocondrie în citosol ca o consecință a pierderii $\Delta\psi_m$, și sprijină noțiunea că scăderea observată poate fi atribuită reducerii nivelului mitocondrial de superoxid. În favoarea acestei ipoteze pot fi obținute unele informații diferite, însă relevante, prin determinarea variațiilor nivelului celular de H₂O₂ produs de quercetină. După o expunere de o oră la 50 μM QC, fluorescența indicatorului de H₂O₂, CM-H₂DCFDA, a scăzut cu 29%, și chiar după îndepărtarea flavonoidului a rămas sub nivelul de control pentru cel puțin 6 h (Fig. 4C). Mai mult, quercetina a demonstrat o capacitate impresionantă de prevenire a unei producții celulare masive de H₂O₂ indusă de către o doză ridicată de menadionă. Astfel, 250 μM MD au determinat o creștere de 7 ori a fluorescenței CM-H₂DCFDA, care a fost atinsă în aproximativ 40 min. de la adăugarea MD și a fost apoi urmată de o scădere modestă și foarte lentă în următoarele 60 min. (Fig. 4D). Atunci când s-au adăugat 50 μM QC în cuvă,

fluorescența CM-H₂DCFDA a scăzut în mod constant cu cca. 30% (relativ la control) în 1 h. Mai mult, adăugarea ulterioară a 250 μM MD nu a părut să afecteze rata de scădere impusă de quercetină, astfel încât fluorescența CM-H₂DCFDA a continuat să scadă timp de cel puțin 25 min. după adăugarea menadionei (Fig. 4D).

Atunci când s-a adăugat menadiona (250 μM) după un timp mai scurt (30 min.) de expunere la quercetină, nivelul de H₂O₂ a continuat să scadă pentru cca. 20 min., totuși cu o viteză mai mică, apoi s-a stabilizat pentru următoarele 20 min., și în final a părut să crească din nou (Fig. 4E). Pentru a facilita comparația, datele extrase din traseul (roșu) arătat în Fig. 4D sunt ilustrate și în Fig. 4E.

Investigațiile noastre curente indică faptul că expunerea acută a celulelor Jurkat la 50 μM QC timp 1 h diminuează nivelul mitocondrial de superoxid și conținutul celular de H₂O₂, și previne în mod eficient producerea extinsă de H₂O₂ indusă de menadionă. În pofida puternicului caracter antioxidant manifestat de către flavonoid, acest tratament cu QC a întărit semnificativ efectul antiproliferativ al menadionei. Datele obținute indică, de asemenea, că eliberarea de calciu este un pas critic în inducerea morții celulare de către QC, cel mai probabil pe calea unei supraîncărcări prelungite a mitocondriei cu Ca²⁺. În studii anterioare [11, 14] am găsit că un pre-tratament pe termen scurt cu 10 μM QC timp de 1 h a intensificat semnificativ apoptoza indusă de 250 μM MD. În linie cu acele studii, rezultatele noastre prezente indică faptul că pre-tratamentul cu 50 μM QC timp de 1 h intensifică substanțial moartea celulară indusă de 250 μM MD. Totuși, am arătat aici că, contrar a ceea ce ne așteptam, această intensificare nu se datorează producerii de ROS, ci este cel mai probabil rezultatul unei aboliri (disruption) mai severe și mai prelungite a Δψ_m așa cum s-a observat în faza inițială care a urmat îndepărtării agentului (Fig. 2C).

Investigații realizate în laboratorul nostru [11, 14] au arătat că QC și MD, ca și ROT sunt apoptogeni potenți în celulele Jurkat de leucemie umană. Rezultatul prezent privind faptul că celulele tratate separat cu fiecare dintre cei trei agenți au prezentat la momente de timp similare o tendință de revenire din disfuncționalitatea mitocondrială indusă inițial este consistent cu ideea că, după parcurgerea fazelor foarte timpurii ale apoptozei, ATP este totuși necesar pentru a inclina balanța în favoarea progresiei ulterioare spre apoptoză, și nu spre necroză. Astfel, s-a raportat că inducția apoptozei de către ROT se produce ireversibil la 20 min. de la expunere [9], ceea ce este în acord cu rezultatele noastre prezente.

Datele de față sugerează, de asemenea, că două molecule de antimicină A se leagă cooperativ de Complexul III (Tabel 4), consistent cu noțiunea că Complexul III este un homodimer care poate să lege moleculă de AM per dimer [15]. Mai mult, s-a raportat anterior legarea cooperativă a AM la Complexul III [15-17]. Luate împreună, toate aceste date și observații întăresc concluziile noastre și sprijină ideea că hiperpolarizarea mitocondrială indusă de QC, observată în celulele Jurkat este mediată în primul rând de în mod primar intensificarea activității respiratorii.

Rezultatele prezente privind faptul că QC poate acționa fie în sinergie fie în antagonism cu menadiona, depinzând de nivelul dozei și efectului, încurajează studii ulterioare în scopul găsirii ferestrelor de doză optimă pentru combinațiile QC-MD astfel încât să poată să fie țintit selectiv fie un efect protector fie unul citotoxic spre celulele normale, respectiv canceroase. Într-adevăr, un număr de studii *in vitro* au raportat că celulele maligne ar putea fi mai susceptibile decât cele normale la citotoxicitatea unor flavonoizi. Astfel, numai puțini agenți, incluzând quercetina, sunt pe moment cunoscuți a poseda un asemenea potențial pentru eliminarea selectivă a celulelor canceroase exercitând în același timp un efect citoprotector față de celulele normale [18-20]. Prin urmare, aceste proprietăți benefice ale quercetinei ar putea fi utilizate în scopul creșterii eficienței chimioterapiilor standard antileucemice, prin maximizarea efectelor distructive intrinseci ale principalilor agenți chemoterapeutici care țintesc celulele canceroase, și minimizând de asemenea efectele secundare ale tratamentului. Într-adevăr, participarea quercetinei în combinație ar putea permite o reducere semnificativă a dozei agentului chemoterapeutic, concomitent cu furnizarea unei protecții sporite a țesuturilor sănătoase și cu o rată a apoptozei celulelor canceroase potențial crescută, limitând astfel întinderea efectelor inflamatorii imediate și micșorând de asemenea riscul efectelor pe termen lung cum ar fi cancerul secundar.

Rezultatele acestui studiu au fost prezentate într-un articol trimis la o revistă ISI [21] și la o conferință internațională [22].

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE SELECTIVE

1. De Marchi, U., Biasutto, L., Garbisa, S., Toninello, A., Zoratti, M., 2009. Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1425-1432.
2. Biasutto, L., Dong, L.F., Zoratti, M., Neuzil, J., 2010. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. *Mitochondrion* 10, 670-681.
3. Floreani, M., Carpenedo, F., 1992. One- și two-electron reduction of menadione in guinea-pig și rat cardiac tissue
4. Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., Robinson, J.P., 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* 278, 8516-8525. *Gen. Pharmacol.* 23, 757-762.
5. Xu, X., Arriaga, E.A., 2009. Qualitative determination of superoxide release at both sides of the mitochondrial inner membrane by capillary electrophoretic analysis of the oxidation products of triphenylphosphonium hydroethidine. *Free Rad. Biol. Med.* 46, 905-913.
6. Baran, I., Ganea, C., Ursu, I., Baran, V., Calinescu, O., Iftime, A., Ungureanu, R., Tofolean, I.T., 2011. Fluorescence properties of quercetin in human leukemia Jurkat T-cells, *Rom. J. Phys.* 56, 388-398.
7. Baran, I., Katona, E., Ganea, C., 2013. Quercetin as a fluorescent probe for the ryanodine receptor activity in Celulele Jurkat. *Pflügers Arch.* 465, 1101-1119.
8. Chou, T.C., 2010. Drug combination studies și their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 70, 440-446.
9. Isenberg, J.S., Klaunig, J.E., 2000. Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells. *Toxicol. Sci.* 53, 340-351.
10. Gutman, M., Singer, T.P., Casida, J.E., 1969. Role of multiple binding sites in the inhibition of NADH oxidase by piericidin și rotenone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 615-622.
11. Baran, I., Ganea, C., Privitera, S., Scordino, A., Barresi, V., Musumeci, F., Mocanu, M.M., Condorelli, D.F., Ursu, I., Grasso, R., Gulino, M., Garaiman, A., Musso, N., Cirrone, G.A.P., Cuttone, G., 2012. Detailed analysis of apoptosis și delayed luminescence of human leukemia Jurkat T cells după proton-irradiation și treatments cu oxidant agents și flavonoids. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, Article ID 498914.
12. Irina Baran, Diana Ionescu, et al., Mitochondrial respiratory Complex I probed by delayed luminescence spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 2013, (trimis, sub revizie)
13. Fiorani, M., Guidarelli, A., Blasa, M., Azzolini, C., Candiracci, M., Piatti, E., Cantoni, O., 2010. Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage și release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. *J. Nutr. Biochem.* 21, 397-404.
14. Baran, I., Ganea, C., Scordino, A., Musumeci, F., Barresi, V., Tudisco, S., Privitera, S., Grasso, R., Condorelli, D.F., Ursu, I., Baran, V., Katona, E., Mocanu, M.M., Gulino, M., Ungureanu, R., Surcel, M., Ursaciuc, C., 2010. Effects of menadione, hydrogen peroxide și quercetin on apoptosis și delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell Biochem. Biophys.* 58, 169-179.
15. Covian, R., Gutierrez-Cirlos, E.B., Trumppower, B.L., 2004. Anti-cooperative oxidation of ubiquinol by the yeast cytochrome *bc1* complex. *J. Biol. Chem.* 279, 15040-15049.
16. Berden, J.A., Slater, E.C., 1972. The allosteric binding of antimycin to cytochrome *b* in the mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 256, 199-215.
17. Lenaz, G., Genova, M.L., 2007. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C1221-1239.
18. Chen, D., Daniel, K.G., Chen, M.S., Kuhn, D.J., Landis-Piwowar, K.R., Dou, Q.P., 2005. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors și apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1421-1432.
19. Jeong, J.H., An, J.Y., Kwon, Y.T., Rhee, J.G., Lee, Y.J., 2009. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J. Cell. Biochem.* 106, 73-82.
20. Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L., Huang, S.L., 2003. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1215-1222
21. Irina Baran, Diana Ionescu, et al., Novel insights into the antiproliferative effect of quercetin, menadione and rotenone in human leukemia Jurkat T cells, *Leukemia Research*, 2013 (trimis, sub revizie)
22. Ionescu D., Ganea C, et al., Quercetin exerts its antitumoral effect while manifesting a strong antioxidant character, 9th EBSA European Biophysics Congress, *Eur Biophys J* (2013) 42 (Suppl 1):S1-S236

Investigarea corelației dintre luminescența întârziată (DL) și Complexul I al lanțului respirator mitochondrial (faza a III-a)

În acest studiu am realizat o analiză detaliată a proprietăților emisiei DL a celulelor Jurkat folosind tratamente cu rotenon (ROT), menadionă (MD) și quercetină (QC). Toate cele trei substanțe împărtășesc similarități structurale nete cu ubiquinona (Q) și pot deci să se lege la Complexul I (Fig. 1), în interiorul sau aproape de buzunarul de legare a Q. ROT, un inhibitor specific al respirației mitochondriale [1,2], se leagă în Complexul I la două situsuri distincte, care nu interacționează [3-5]. Aceste situsuri ROT, denumite situsul 1 ROT și situsul 2 ROT, sunt cel mai probabil situate în subunitățile 49-kDa și ND1 ale Complexului I, respectiv [3]. Cele două situsuri ROT, care prezintă afinități diferite pentru inhibitor [6], par a fi implicate în transferul de electroni direct și invers, respectiv [5]. Este larg acceptat că în modul direct (implicând situsul 1) ROT întrerupe fluxul de electroni la nivelul ubiquinonei legate de

proteină adiacent centrului N2 (Q_{Nf} [7]), specific prin destabilizarea ubisemiquinonei produsă după acceptarea primului electron de la centrul N2 [7]. Ca o consecință directă a blocajului cu rotenon, respirația încetează și nivelul intracelular de NADH crește datorită lipsei consumului de către mitocondrie. Mai mult, electronii acumulați sunt deviați dinspre Complexul I către oxigenul molecular din jur, producând astfel superoxid ($O_2^{\cdot-}$) la rate ridicate, eliberat apoi în matrice [1]. Superoxidul produs de către lanțul transportor de electroni mitocondrial este convertit rapid la peroxid de hidrogen (H_2O_2) prin acțiunea superoxid dismutazelor mitocondriale. Rotenonul și în general rotenozii au demonstrat o activitate anticancer care a fost atribuită inducerii apoptozei [8,9]. Efectele apoptotice ale rotenonului asupra celulelor de leucemie umană Jurkat T au fost demonstrate de câteva studii în care au fost folosite doze și timpi de aplicare particulari [9,10]. Totuși, datele raportate referitor la apoptoza indusă de rotenon în celulele Jurkat sunt extrem de limitate. În lucrarea de față, noi am realizat un studiu sistematic privind efectele rotenonului asupra apoptozei, al nivelurilor de NADH și FMN oxidat (FMN_{ox}) în celule Jurkat, sub tratamente de diferite durate și doze. De asemenea, raportăm, în premieră, efectul rotenonului asupra supraviețuirii clonogene.

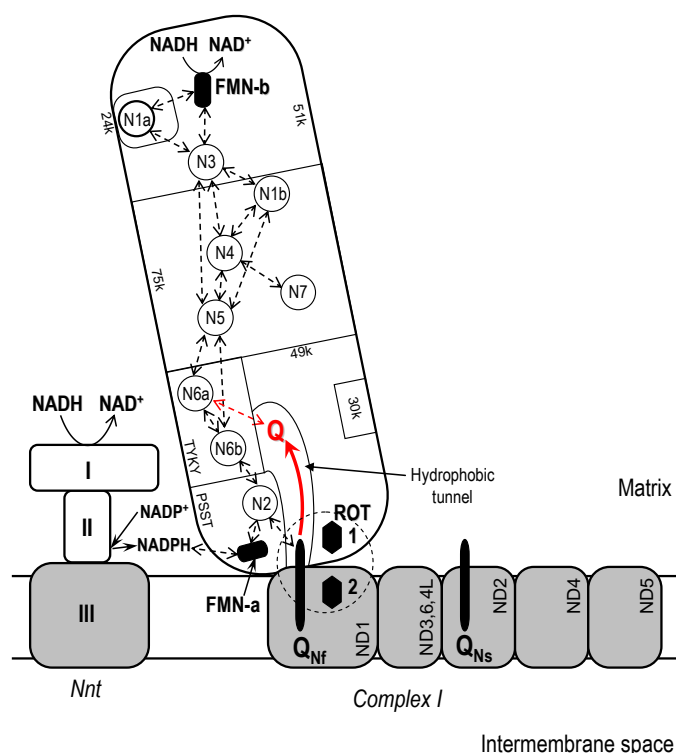


Fig. 1. Reprezentare modulară a arhitecturii Complexului I. Sunt reprezentate schematic cele șapte subunități hidrofille principale și cele șapte subunități membranare, marcate conform cu nomenclatura subunităților Complexului I uman [3]. Pentru simplitate, subunitățile ND3, ND6 și ND4L sunt cuprinse într-un singur modul. Pozițiile relative ale diferitelor subunități și ale centrilor Fe/S sunt prezentate doar calitativ. Săgețile întrerupte indică posibilele reacții de transfer de electroni. Sunt ilustrate cele două grupări prostetice FMN și interacțiunea lor cu NADH/NADPH. Sunt specificate situsurile ROT (1 și 2) și cele două ale Q (Q_{Nf} și Q_{Ns}). Cercul întrerupt cuprinde buzunarul de legare al Q la interfața dintre domeniile hidrofille și hidrofobe ale Complexului I. Q poate aluneca de-a lungul presupusului tunel hidrofob format între subunitățile de 49-kDa și PSST, și poate interacționa cu centrul N6a. Interacțiunea Nnt - Complex I poate regla reducerea FMN-a pe calea controlului raportului local NADPH/NADP⁺ prin Nnt [3] (aici, este ilustrat numai un monomer Nnt; sunt arătate cele trei domenii specifice ale monomerului, I, II (domeniile extramembranare) și III (domeniul membranar)).

O a doua substanță medicamentoasă utilizată în investigațiile noastre - menadiona, un stimulator comun al producerii de superoxid mitocondrial, este un analog de quinonă care este folosit și ca agent chemoterapeutic în tratamentul leucemiei [11,12]. Reducerea menadionei în Complexul I mitocondrial [13,14], care răspunde de ~50% din metabolismul său, poate avea ca rezultat formarea unei semiquinone cu producerea consecutivă de superoxid [1,14]. S-a raportat, de asemenea, că menadiona crește activitatea Complexului I și deci consumul de NADH în cazul fracțiilor submitocondriale de ficat de șoarece, deși nu afectează rata preluării de O_2 în acele preparate [13]. În alte studii s-a găsit că menadiona stimulează consumul de oxigen celular [15,16]. Consistent cu aceste rapoarte,

rezultatele noastre curente indică faptul că menadiona descrește concentrația NADH mitocondrial în celulele Jurkat prin stimularea activității Complexului I.

Pentru a substanția în plus legătura dintre DL și Complexul I, care a fost inițial sugerată de rezultatele experimentelor noastre cu ROT și MD, am folosit și flavonoidul quercetină, datorită abilității sale de a se comporta ca o moleculă de tip ubiquinonă (ubiquinone-like) permițând astfel legarea sa la Complexul I [17]. În studii anterioare, am determinat faptul că QC descrește conținutul celular al NADH [18-20], însă mecanismul aflat la baza acestei observații este încă neclar, având în vedere raportările contradictorii privind efectele quercetinei asupra activității Complexului I. Este probabil ca în experimentele noastre QC, ca și menadiona, să stimuleze activitatea Complexului I în celulele Jurkat, ducând la o rată crescută a consumului de NADH. Având în vedere efectele comune ale acestor agenți la nivelul Complexului I, am putut investiga în detaliu legătura dintre luminescența întârziată și metabolismul mitocondrial. Rezultatele noastre curente demonstrează clar că emisia de fotoni ultra slabă indusă de fotoni în celulele Jurkat este legată cantitativ de nivelul mitocondrial NADH și de cel al FMN oxidat, sprijinind ideea că DL este produsă majoritar în sistemul mitocondrial de transfer de electroni la nivelul Complexului I. Aceste date furnizează informații noi privind organizarea funcțională și structurală a Complexului I respirator.

MATERIALE ȘI METODE

Culturi celulare. Limfoblastii de celule leucemice umane Jurkat T au fost cultivați în suspensie în mediu RPMI 1640 suplimentat cu 5% ser bovin fetal inactivat prin căldură, 2 mM L-glutamină, 100 unități/ml penicilină și 100 μg/ml streptomycină, la 37°C într-un incubator umidificat cu atmosferă de 5% CO₂. Celule cu creștere exponențială au fost ajustate la o densitate de 0.2 × 10⁶ celule/ml în ziua anterioară experimentului. Am folosit soluție 30% de peroxid de hidrogen și soluții stoc de bisulfid de sodiu de menadionă în tampon fosfat salin (PBS), sau quercetină dihidrat dizolvată în dimetil sulfoxid (DMSO). Dacă nu se specifică altfel, toate chimicalele au fost cumpărate de la Sigma-Aldrich. După fiecare tratament celulele au fost spălate bine cu PBS și resuspendate în PBS la temperatura camerei (20°C) (pentru probele DL, ~40 × 10⁶ celule/ml, ori pentru spectrofluorimetrie, ~1 × 10⁶ celule/ml) ori în mediu complet pentru evaluarea apoptozei (~0.2 × 10⁶ celule/ml). Probele DL și fluorimetrice au fost analizate imediat prin spectroscopie DL și de fluorescență. Densitatea, viabilitatea și morfologia celulară au fost examinate cu o cameră CCD Logitech QuickCam Pro 4000, conectată la un microscop cu contrast de fază Olympus CK30. Pentru evaluarea densității celulare, alicote de 25 μl din probele pentru DL au fost diluate în PBS, colorate cu 0.4% soluție de albastru tripan și ~1500-2000 celule au fost numărate cu un hemocitometru Bürker la momentul măsurătorii DL. Evaluarea numărării celulare a fost realizată atât în timpul experimentelor DL cât și prin inspectare vizuală la microscop și, ulterior, prin analiza micrograțiilor cu ajutorul programului ImageJ.

Evaluarea supraviețuirii celulare. După tratament, celulele au fost spălate cu PBS cald și cultivate în 96 de godeuri la o densitate de 3, 4 ori 10 celule/godeu în 100 μl de mediu complet per godeu. După 4 săptămâni de incubare, au fost numărate la microscopul în contrast de fază godeurile în care existau colonii cu >50 celule. Eficiența de cultivare a fost calculată ca fiind $\ln[96/(\text{nr. de godeuri negative})]/(\text{densitate celulară}) \times 100$. Supraviețuirea celulară a fost determinată ca raportul dintre eficiența de cultivare a celulelor tratate și, respectiv, netratate.

Citometria în flux. La timpii specificați, după tratament, probele conținând 10⁶ celule au fost spălate cu PBS și incubate cu 5 μl Annexin V-FITC (Apoptosis detection kit, BD Pharmingen) și 2.5 μl 7-AAD (BD Pharmingen) în 100 μl Annexin V Binding Buffer timp de 15 min. la întuneric. S-au adăugat apoi probelor 400 μl de Annexin V Binding Buffer și probele au fost apoi analizate cu un citometru în flux Becton Dickinson FACS Calibur. Lungimea de undă de excitare fost 488 nm și emisia a fost colectată cu filtre trece bandă 530 nm (FITC) și >670 nm (7-AAD). Pentru achiziția de date am utilizat programele CellQuest și respectiv WinMDI 2.9. Celulele negative atât pentru Annexin V-FITC cât și pentru 7-AAD au fost considerate ca celule vii, pe când cele pozitive pentru Annexin V-FITC și negative pentru 7-AAD au fost considerate ca celule apoptotice timpurii și cele pozitive pentru ambii indicatori au fost considerate ca celule apoptotice/necrotice târzii.

Spectroscopia de luminescență întârziată. Am utilizat o variantă îmbunătățită a sistemului ARETUSA [49], 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 ± 5 μJ/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. În unele determinări s-au folosit două filtre interferențiale Lot-Oriel de bandă largă (ca. 80 nm FWHM), dispuse circular între probă și fotomultiplicator pentru a selecta fotoni cu lungimi de undă de 460 (albastru), respectiv 645 nm (roșu). Semnalele detectate au fost achiziționate cu un dispozitiv multicanal (Ortec MCS PCI), cu un pas minim de timp 200 ns. Măsurătorile DL s-au făcut pentru minimum 3 picături diferite din fiecare eșantion de celule (volumul picăturii 15-25 μl) la temperatura camerei (20 ± 1°C). Luminescența PBS s-a scăzut din fiecare înregistrare. Fotoemisia a fost înregistrată între 11 μs și 100 ms după excitarea cu laser. Intensitatea DL (*I*) a fost obținută ca fiind numărul de fotoni înregistrat într-un anumit interval de timp divizat prin acel interval de timp și prin numărul de celule vii din picătură. Randamentul cuantic a fost calculat în trei domenii temporale ale emisie DL: 11-100 μs (DL-I), 100 μs - 1 ms (DL-II) și 1-10 ms (DL-III), ca raportul dintre integrala lui *I* și energia laserului. Intensitatea DL galben/verde a fost estimată prin scăderea contribuției aditive a intensităților DL albastru și roșu din intensitatea DL VIS. Datele de scădere în timp a curbelor de fotoemisie DL au fost fitate cu o ecuație de tip: $y = \sum A_i \exp(-t/\tau_i)$ cu un număr variabil de componente exponențiale. Pentru fiecare set de date de emisie DL, VIS, albastru, verde/galben sau roșu, constantele de timp de scădere (τ_i) și numărul minim de componente DL exponențiale ale DL s-au stabilit din cel mai bun fit simultan pentru toate curbele DL obținute cu celulele control și cu cele tratate cu rotenon în setul respectiv de date spectroscopice. Apoi randamentul DL corespunzător fiecărei componente cinetice s-a calculat

pentru fiecare curbă DL individuală ca fiind produsul $A_i \tau_i$. Pentru a facilita comparația dintre diferitele componente spectrale DL, care au prezentat unele diferențe semnificative în cinetica de emisie, produsul cuantic al DL a fost calculat în unele cazuri în trei domenii ale emisiei DL, corespunzând celor trei clase principale de emisie de lumină: 11-100 μs (S_1), 100 μs - 1 ms (S_2) și 1-10 ms (S_3), ca integrala funcțiilor de fitare I pe domeniul de timp respectiv. Această analiză nu a putut să fie realizată într-o manieră consistentă în domeniul de timp 10-100 ms, deoarece în unele cazuri raportul semnal/zgomot a fost prea mare în această regiune. **Spectrofluorimetrie.** Pentru a determina nivelurile de NADH și FMN_{ox} , 2 ml din probele celulare preparate în PBS așa cum s-a descris au fost plasați într-o cuvă de cuarț acoperită de 2 ml menținută la 20°C sub agitare continuă într-un spectrofluorimetru Horiba Jobin Yvon echipat cu două monocromatoare. Toate fantele au fost fixate la 5 nm. După 5 min. necesare echilibrării termice, s-au colectat spectrele de emisie în triplicat cu excitare la 340 nm pentru NADH [55,56] și la 450 nm pentru FMN_{ox} . Intensitatea fluorescenței a fost mediată, corectată pentru fond și apoi normalizată la densitatea celulară. **Nivelul mitocondrial de NADH**, $[\text{NADH}]_m$, a fost cuantificat ca fiind raportul dintre fluorescența emisă la 450 nm și cea emisă la 374 nm. În celulele control (ne-tratate), acest raport a fost 1.86 ± 0.31 ($n = 18$). Raportul de fluorescență a NADH obținut cu celulele tratate a fost normalizat la valoarea medie corespunzătoare a celulelor control (1.86). Trebuie să menționăm că în experimentele curente, nivelul celular de NADH, presupus a fi proporțional cu emisia de fluorescență la 450 nm cu excitare la 340 nm, a prezentat trăsături care au fost relativ similare cu cele ale NADH mitocondrial, indicând faptul că NADH mitocondrial constituie, în condițiile noastre, componenta majoră a NADH celular, în acord cu alte raportări [review-ul [21]]. S-a presupus, de asemenea, că concentrația NADPH este mult mai redusă decât cea a NADH [21]. **Nivelul de FMN_{ox}** este exprimat ca emisia de fluorescență la 515 nm cu excitare la 450 nm [22]. În experimentele cu quercetină, datorită suprapunerii spectrale consistente a celor două specii fluorescente, fluorescența FMN a fost înregistrată cu excitare/emisie la 485 nm/515 nm, acolo unde fluorescența quercetinei este foarte slabă [18,20]. **Statistica.** Dacă nu se indică altfel, datele sunt prezentate ca media \pm e.m.s. pentru cel puțin trei măsurători diferite. **Fitarea datelor** s-a realizat cu programul Origin, versiunea 7.5. Alte detalii se găsesc în raportul *in extenso* și în publicația aflată în revizie la o revistă ISI [23].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Efectul ROT asupra supraviețuirii clonogene și apoptozei. Rotenonul a descrescut supraviețuirea clonogenă a celulelor Jurkat într-o manieră dependentă de doză (Fig. 2A). Rotenonul induce, de asemenea, apoptoza în funcție de doză, ceea ce se corelează bine cu supraviețuirea clonogenă (Fig. 2B). Cinetica de inducție a apoptozei apare a fi relativ lentă, întrucât la 48 h după tratament s-a găsit un număr semnificativ de celule în fazele apoptotice timpurii. Evoluția specifică a apoptozei prin stări timpurii/târzii indică ferm faptul că rotenonul induce preferențial apoptoză și nu necroză, în celulele Jurkat. Această concluzie a fost substanțiată și prin analiza de împrăștiere laterală.

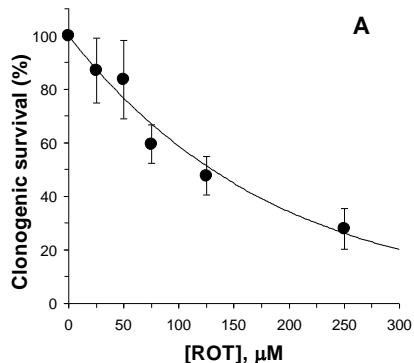
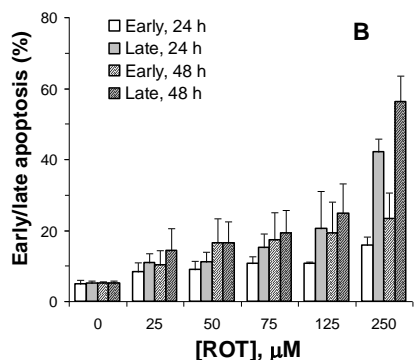


Fig. 2. Dependența supraviețuirii clonogene (A) și a apoptozei (B) de doza de rotenon. Celulele Jurkat au fost expuse timp de 30 min. la dozele de rotenon indicate și apoi rezultatele înregistrărilor au fost procesate pentru evaluarea supraviețuirii clonogene și a stadiilor timpurii/târzii ale apoptozei așa cum s-a descris în Materiale și Metode. Datele din panelul A au fost fitate cu ecuația $y = 100 \times K_d^H / (x^H + K_d^H)$ cu $K_d = 114.7 \mu\text{M}$ și $H = 1.35$. În B, fracțiile apoptotice timpurii și târzii au fost evaluate la 24 h și 48 h după înlăturarea agentului.



Efectul ROT, QC, MD și H_2O_2 asupra nivelurilor de NADH și FMN_{ox} .

Am investigat pe cale spectrofluorimetrică efectul rotenonului asupra nivelului mitocondrial de NADH și FMN oxidat (FMN_{ox}). Așa cum era de așteptat, măsurătorile în stare staționară (Fig. 3) și înregistrările cinetice au arătat că în celulele Jurkat tratate cu ROT, nivelul de NADH a crescut substanțial. Mai mult, inhibiția Complexului I de către ROT a fost confirmată adițional de determinări fluorimetrice separate ale nivelului de superoxid mitocondrial, care a prezentat o creștere consistentă după adăugarea rotenonului. Nivelul de FMN_{ox} a crescut, de asemenea, după adăugarea rotenonului (Fig. 3), reflectând probabil un efect direct al NADH asupra ratei de oxidare a FMN la nivelul Complexului I în acest tip de celule. Din măsurătorile de stare staționară efectuate după tratamente cu doze crescătoare de rotenon (Fig. 3A), s-au estimat constanta microscopică de disociere asociată cu legarea ROT la Complexul I ($\approx 33 \mu\text{M}$), și coeficientul Hill (2.0-2.4). Acestea indică legarea cooperativă a cel puțin două

molecule de rotenon la oligomerul Complex I, deoarece coeficientul Hill pentru legarea rotenonului la Complexul I în modul direct (situsul 1 implicat) s-a determinat a fi 1 [24]. Important, datele noastre, coroborate de rezultatele adiționale prezentate mai jos, sugerează că în celulele Jurkat intacte, Complexul I funcționează mai ales ca un dimer în care două molecule de rotenon se leagă cooperativ de situsul 1 corespunzător al ROT. Datele prezentate în Fig. 3B indică că efectul rotenonului a fost complet în cca. 60 min. Într-adevăr, tratamente cu 50 μM ROT timp de 30 min., 60 min. ori 90 min. au avut efecte similare asupra nivelurilor de NADH și FMN_{ox}. Totuși, ușoara reducere de $\approx 10\%$ vizibilă după tratamentul de 90 min., coroborată cu rezultatele din spectroscopia DL, indică că la tratamente mai îndelungate cu ROT poate fi indusă o modificare conformațională în Complexul I.

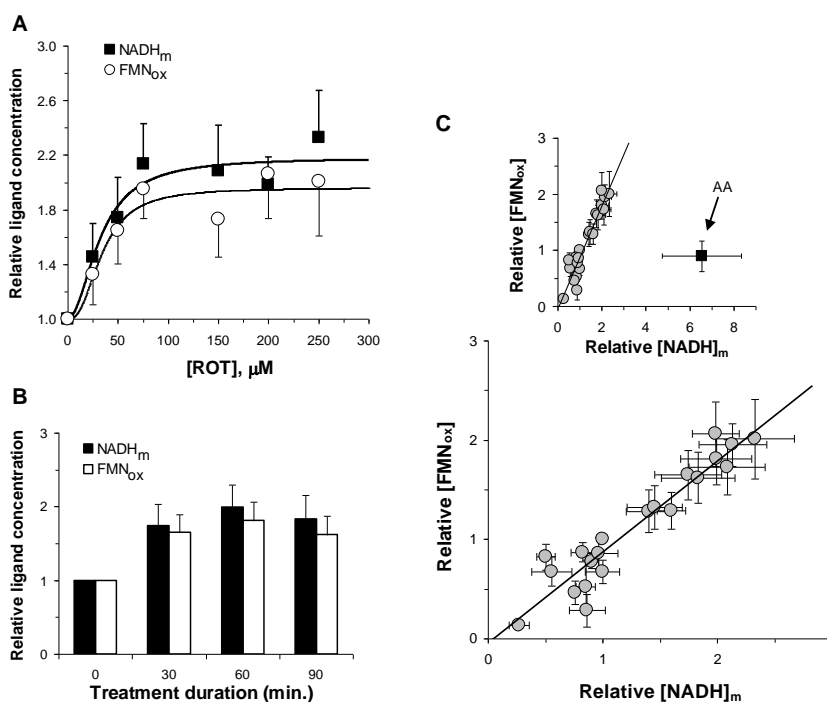


Fig. 3. Efectele unui tratament de 30 min. cu rotenon asupra nivelurilor de NADH și FMN_{ox} în celulele Jurkat. **(A)** Concentrația relativă a ligandului (normalizată la control) a depins într-o manieră de tip Hill de doza de rotenon. Datele au fost fitate cu ecuația: $c = 1 + c_{\text{max}} \times [\text{ROT}]^h / ([\text{ROT}]^h + K_d^h)$. Pentru setul de date cu NADH, $K_d = 32.5 \mu\text{M}$, $h = 1.97$ și $c_{\text{max}} = 1.18$. Pentru setul de date cu FMN_{ox}, $K_d = 33.6 \mu\text{M}$, $h = 2.37$ și $c_{\text{max}} = 0.96$. **(B)** Dependența nivelurilor de NADH și FMN_{ox} de durata expunerii la ROT, pentru o doză fixă de 50 μM rotenon. **(C)** Concentrațiile NADH și FMN_{ox} după tratamentele cu rotenon, menadionă, quercetină și H₂O₂ sunt strâns corelate. Linia ($y = 0.916x - 0.0456$) a fost obținută prin fitul linear pentru date. *Inset*, comparația dintre efectele ROT, MD, QC și H₂O₂ și efectul antimicinei A (AA, indicat prin săgeată). Datele utilizate în C sunt indicate în Tabelul 1.

Am investigat, de asemenea, efectul quercetinei, menadionei și H₂O₂ asupra concentrației mitocondriale de NADH ori de FMN oxidat. În acord cu raportările noastre anterioare [18-20], măsurătorile noastre curente au confirmat faptul că QC scade nivelul de NADH în celulele Jurkat. În plus, quercetina a deprimat, de asemenea, nivelul de FMN oxidat (Tabelul 1). Menadiona are efecte similare, descrescând considerabil atât concentrația NADH cât și pe cea a FMN_{ox} în celulele Jurkat (Tabelul 1). Concentrații înalte de H₂O₂ (100 μM și 500 μM) aplicate timp de 20 min. nu produc variații semnificative ale [NADH]_m și au produs numai o ușoară scădere a [FMN_{ox}] (Tabelul 1).

Luată împreună, datele fluorimetrice pentru starea staționară prezentate aici demonstrează o corelație lineară puternică între nivelul de NADH și cel de FMN_{ox} în celulele Jurkat tratate cu ROT, MD, QC, combinații de QC și MD, și H₂O₂ (Fig. 3C, Tabel 1). Coeficientul Pearson de corelație asociat cu aceste date a fost $r = 0.93$. În plus, am găsit că în condiții similare, antimicina A (AA), un inhibitor al Complexului III respirator, a indus o creștere substanțială a [NADH]_m dar nu a avut un efect măsurabil asupra [FMN_{ox}] (Fig. 3C, inset). Colectiv, aceste date sugerează că quercetina, menadiona și rotenonul acționează la nivelul Complexului I mitocondrial și cel mai probabil declanșează

conversia enzimei la o nouă stare conformațională, în care NADH legat la Complexul I accelerează oxidarea FMN redus. Aceste date sugerează de asemenea că flavoproteina principală detectată în condițiile noastre, este cel mai probabil FMN legat la Complexul I.

Tabel 1. Nivelurile relative de NADH și FMN_{ox} și produsul cuantic al DL în celule Jurkat expuse la ROT, MD, H₂O₂, QC, combinații de QC și MD ori H₂O₂, și AA.

Tratament	Spectrofluorimetrie		Spectroscopie DL			
	[NADH] _m relativ	[FMN _{ox}] relativ	Produsul cuantic al DL (VIS)	Produsul cuantic al DL (albastru)	Produsul cuantic al DL (verde/galben)	Produsul cuantic al DL (roșu)
Control	1	1	0.970	0.276	0.335	0.359
25 μM ROT × 30 min.	1.46 ± 0.24	1.32 ± 0.22	1.547	0.534	0.537	0.476
50 μM ROT × 30 min.	1.74 ± 0.29	1.65 ± 0.25	1.939	0.658	0.738	0.543
75 μM ROT × 30 min.	2.13 ± 0.30	1.95 ± 0.21	4.868	1.318	2.764	0.785
150 μM ROT × 30 min.	2.08 ± 0.33	1.73 ± 0.28	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
200 μM ROT × 30 min.	1.98 ± 0.20	2.06 ± 0.32	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
250 μM ROT × 30 min.	2.33 ± 0.34	2.01 ± 0.40	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
10 μM ROT × 60 min.	1.40 ± 0.20	1.28 ± 0.22	1.224	0.372	0.510	0.341
25 μM ROT × 60 min.	1.60 ± 0.12	1.29 ± 0.18	2.346	0.731	0.622	0.525
50 μM ROT × 60 min.	1.99 ± 0.31	1.81 ± 0.26	4.979	1.586	2.100	1.293
50 μM ROT × 90 min.	1.83 ± 0.32	1.62 ± 0.26	2.535	0.677	1.157	0.701
25 μM MD × 20 min.	0.82 ± 0.10	0.87 ± 0.10	0.577	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
25 μM MD × 4 h	0.50 ± 0.08	0.82 ± 0.13	0.332	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
250 μM MD × 20 min.	0.55 ± 0.18	0.68 ± 0.15	0.319	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
100 μM H ₂ O ₂ × 20 min.	0.96 ± 0.17	0.86 ± 0.16	0.852	0.237	0.378	0.237
500 μM H ₂ O ₂ × 20 min.	0.91 ± 0.06	0.77 ± 0.06	0.677	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
10 μM QC × 1 h	0.85 ± 0.09	0.52 ± 0.27	0.702	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
5 μM QC × 24 h	0.76 ± 0.03	0.46 ± 0.12	0.794	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
50 μM QC × 24 h	0.27 ± 0.09	0.13 ± 0.03	0.556	0.220	0.183	0.152
10 μM QC × 1 h, apoi 250 μM MD × 20 min.	0.86 ± 0.16	0.28 ± 0.16	0.362	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
10 μM QC × 1 h, apoi 500 μM H ₂ O ₂ × 20 min.	0.86 ± 0.16	0.28 ± 0.16	0.647	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
150 μM AA × 30 min.	6.53 ± 1.80	0.90 ± 0.27	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

n.d. - nedeterminat

Efectul ROT asupra luminescenței întârziate. Spectroscopia DL în VIS a relevat o amplificare notabilă a DL în urma tratamentelor celulelor Jurkat cu ROT. Emisia de lumină în urma excitării cu UV a prezentat un profil cinetic complex, care a putut fi fitat bine cu o combinație lineară de patru exponențiale, cu timpi de scădere caracteristici de 22.9 μ s, 140 μ s, 1.40 ms și 8.50 ms, respectiv (Fig. 4), indicând existența a patru clase principale de stări de emisie a luminii. Cu tratamente de durată de 30 min., produsele cuantice corespunzătoare asociate cu numărul total de stări excitate ale fiecărei componente au crescut cu doza de ROT (Fig. 4, inset-uri). În aceleași condiții de tratament, cinetica emisiei întârziate de lumină roșie a prezentat șase componente exponențiale dominante, cu timpi de scădere caracteristici de 13.3 μ s, 129 μ s, 388 μ s, 1.70 ms, 3.87 ms și 8.25 ms, respectiv (Fig. 5). Unele dintre aceste componente au produs un randament DL extrem de scăzut la anumite tratamente. De aceea, pentru a obține o descriere unitară și a câștiga informații relevante privind efectul rotenonului asupra DL roșie, am colectat contribuțiile unor componente DL adiacente așa cum se vede în inset-urile din Fig. 5. Luate împreună, aceste date arată că efectul total al ROT este acela de a stimula DL roșie. În continuare, am menținut constantă doza de rotenon și am variat durata tratamentului de la 30 min. la 60 min. și 90 min., respectiv. DL în VIS (Fig. 6) ca și în regiunea roșie a spectrului a prezentat o dependență bifazică de timpul de tratament (Fig. 7), prezentând un maximum la tratamente de 60 min. În particular, s-a observat la emisia întârziată de lumină roșie o creștere marcantă (~ 12 ori) a unei componente distincte, cu constanta de timp de scădere de 129 μ s.

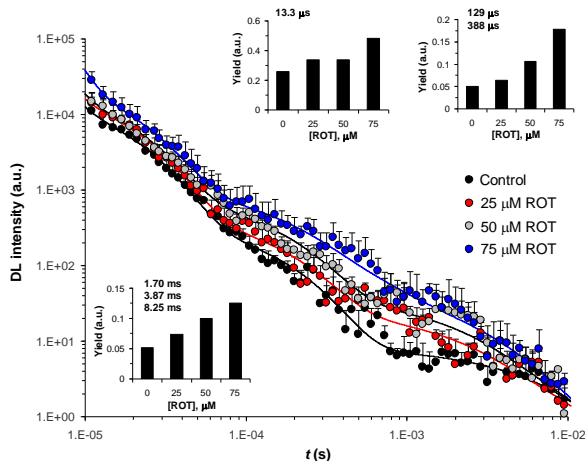
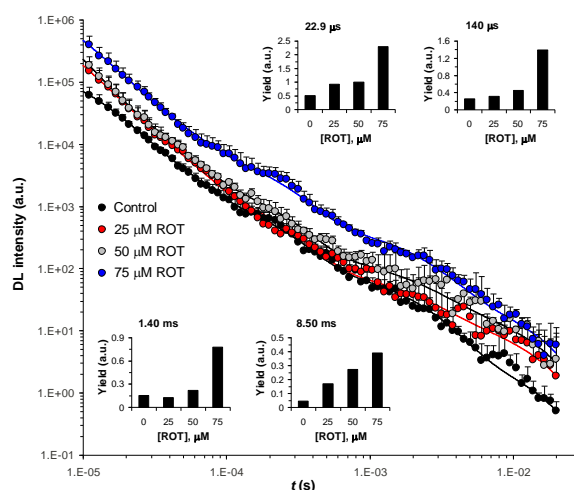


Fig. 4. Cinetica fotoemisiei întârziate în VIS pentru celulele Jurkat expuse timp de 30 min. la DMSO (control) ori la dozele de ROT indicate. Timpul scurs după excitarea cu UV a probei celulare este reprezentat pe abscisă. Fiecare curbă a fost obținută prin fitarea datelor cu ecuația: $y = \sum A_i \exp(-t/\tau_i)$. Inset-urile prezintă dependența de doza de ROT a produsului cuantic al DL (adică, produsul $A_i \tau_i$) corespunzând fiecărei componente cinetice. Sunt indicați timpii caracteristici (τ_i) ai componentelor exponențiale individuale. Prima componentă ($\tau_1 < 10^{-5}$ s) nu este specificată și nu a fost luată în considerare în analiza ulterioară.

Fig. 5. Cinetica fotoemisiei întârziate în roșu pentru celulele Jurkat expuse timp de 30 min. La DMSO (control) ori la dozele de ROT indicate. Fiecare curbă a fost obținută prin fitarea datelor cu ecuația: $y = \sum A_i \exp(-t/\tau_i)$. Inset-uri, dependența de doza de ROT a produsului cuantic al DL ($A_i \tau_i$), produs de trei clase dominante de componente cinetice. Sunt indicați timpii caracteristici (τ_i) ai componentelor exponențiale individuale. Prima componentă ($\tau_1 < 10^{-5}$ s) nu este specificată și nu a fost luată în considerare în analiza ulterioară.



După analizarea emisiei întârziate de lumină în regiunile albastră și verde/galbenă ale spectrului, am putut observa că unele componente cinetice nu au fost comune tuturor componentelor spectrale ale DL. De aceea, pentru a obține o descriere mai generală a caracteristicilor DL și pentru a realiza o comparație consistentă între diferitele domenii spectrale, am considerat trei clase distincte de stări emițătoare de lumină, și anume, o clasă de stări cu scădere rapidă (S_1 , timp de viață ~ 10 μ s) și două clase de stări: intermediară (S_2 , timp de viață ~ 100 μ s) și cu scădere lentă (S_3 , timp de viață ~ 1 ms); această abordare, împreună cu timpii de scădere individuali determinați mai sus, au demonstrat a fi în mod particular utili în identificarea ratelor specifice de transfer de electroni în Complexul I. Rezultatele colectate în Fig. 8 arată că stările de scădere rapidă (S_1) au emis predominant lumină albastră, cu o contribuție ceva mai scăzută a stărilor de emisie de lumină roșu și

verde/galben, în timp ce stările S_2 și S_3 au părut să emită mai ales în regiunea verde/galben, cu o emisie ceva mai semnificativă în albastru și roșu din S_2 înregistrată numai după tratamente cu ROT timp de 60 min. Datele prezentate în Fig. 3B indică că în condițiile noastre, efectul rotenonului atât la nivelul NADH cât și al FMN_{ox} a fost complet în cca. 60 min. Ușoara atenuare a efectului, observabilă după tratamente îndelungate (90 min.), a fost reflectată mai pregnant de către produsul cuantic al DL (Fig. 6-8). Este de conceput faptul că, Complexul I mitocondrial ar putea deveni insensibil la rotenon după o expunere lungă la inhibitor, pe calea unei stări lente de tranziție deactivată/activată [25] care ar putea fi reglată metabolic în celulele intacte. Deci, acest mecanism ar explica revenirea aparentă din inhibiție, care pare a se manifesta în condițiile noastre la expunerile de durată crescută.

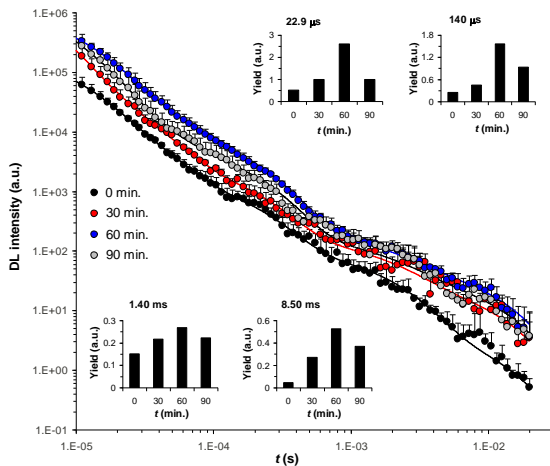


Fig. 6. Cinetica fotoemisieii întârziată în VIS în celulele Jurkat expuse pentru perioadele de timp indicate la DMSO (control) ori la 50 μ M rotenon. Fiecare curbă a fost obținută prin fitarea datelor ca în Fig. 4, utilizând timpii de de scădere caracteristici indicați. *Inset-uri*, dependența produsului cuantic al DL de durata tratamentului. Alte detalii sunt ca în Fig. 4.

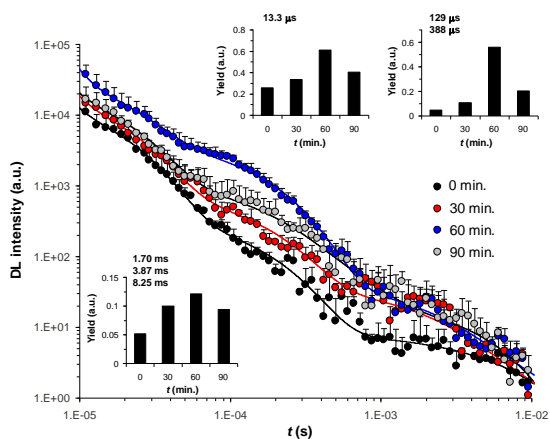


Fig. 7. Cinetica fotoemisieii întârziată în roșu în celulele Jurkat expuse pentru perioadele de timp indicate la DMSO (control) ori la 50 μ M rotenon. Fiecare curbă a fost obținută prin fitarea datelor ca în Fig. 5, utilizând timpii de scădere caracteristici indicați. *Inset-uri*, dependența produsului cuantic al DL de durata tratamentului. Alte detalii sunt ca în Fig. 5.

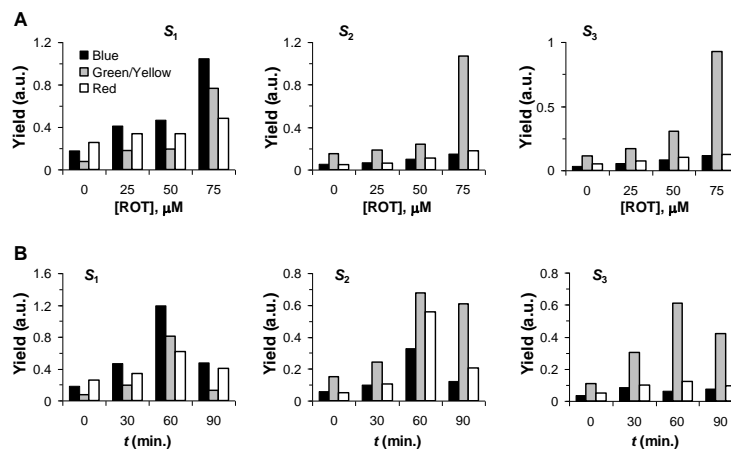


Fig. 8. Analiza spectrală a produsului cuantic al DL ca funcție de (A) doza de ROT în celulele Jurkat expuse pentru 30 min. la concentrațiile indicate de ROT, ori (B) durata taratamentului cu ROT, la o doză fixată de 50 μ M ROT. Produsele cuantice ale DL pentru albastru, verde/galben și roșu au fost calculate pentru trei clase diferite de stări S_1 , S_2 și S_3 , care emit pe diferite scări de timp (detalii în text).

Corelația dintre DL și nivelul de NADH și FMN_{ox}. Datele de spectroscopie DL și datele fluorimetrice pentru NADH/FMN_{ox} au fost colectate după tratamente cu ROT, QC, MD și H₂O₂, ori QC în combinație cu MD ori H₂O₂. Consistent cu raportările noastre anterioare [19,25], quercetina și menadiona au inhibat semnificativ fotoemisia ultra-slabă indusă de fotoni în celulele Jurkat, într-o manieră dependentă de timp și de doză (Tabel 1). H₂O₂ a produs, de asemenea, un efect inhibitor asupra DL, dar într-o măsură mult mai mică (Tabel 1). Combinația de quercetină și menadionă în doze mari a descrescut de asemenea consistent produsul cuantic al DL VIS, în timp ce combinația quercetinei cu o doză înaltă de H₂O₂ a exercitat un efect mai redus (Tabel 1). Luate împreună, datele au relevat o corelație puternică între produsul cuantic total al DL în VIS și concentrația mitocondrială de NADH ori FMN_{ox} (Fig. 9A), care este, de asemenea, robust manifestată pentru toate clasele de stări S₁, S₂ și S₃. Dependența produsului cuantic total al DL VIS atât de [NADH]_m cât și de [FMN_{ox}] a fost fitată foarte bine de o ecuație Hill modificată (Fig. 9A). Interesant, coeficientul Hill aparent al ambilor liganzi a fost estimat a fi 4.3-4.4, care este aproximativ de două ori mai mare decât valoarea estimată mai sus pentru legarea rotenonului la Complexul I oligomeric.

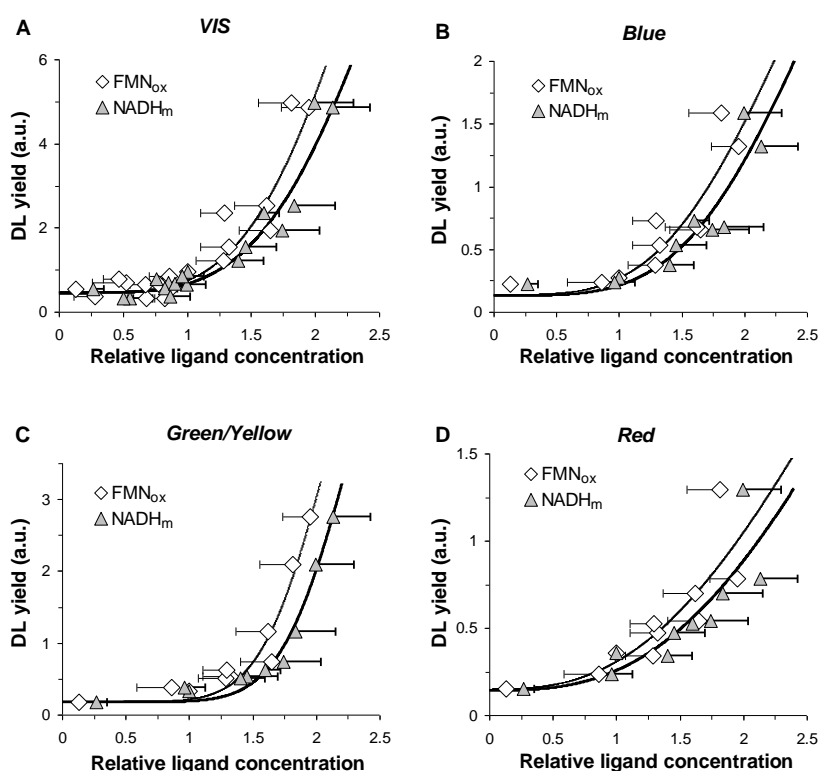


Fig. 9. Dependența produsului cuantic total al DL în VIS (A), albastru (B), verde/galben (C) și roșu (D) de concentrația relativă a NADH sau FMN_{ox}, obținută după tratamentele celulelor Jurkat cu ROT, MD, QUE sau H₂O₂. Produsul cuantic total al DL a fost calculat din emisia pe intervalul de timp 11 μs - 10 ms. Datele (colectate în Tabelul 1) au fost fitate cu ecuația: $y = Y_0 + Y_{\max} \times c^h / (c^h + K_d^h)$ (curbele), unde c este concentrația relativă a ligandului. Fitul datelor VIS-DL s-a făcut cu Y_{\max} la 21.0, valoarea maximă obținută pentru prima componentă exponențială a curbelor de fotoemisie în Fig. 4-5. Fitul componentelor spectrale a fost făcut cu Y_{\max} și Y_0 fixate, care au fost considerate ca o anumită fracțiune a valorilor corespunzătoare în VIS. Frațiunile albastră și roșie au fost setate la 0.291 și 0.318, respectiv, egale cu valorile maxime observate în toate măsurătorile. Frațiunea rămasă, 0.391, a fost atribuită DL verde/galbenă. Parametrii derivați din fit sunt prezentați în Tabelul 2.

Produsul cuantic total al emisieii întârziată în lumină albastră, verde/galbenă sau roșie a prezentat o dependență calitativ similară de [NADH]_m și [FMN_{ox}] (Fig. 9B-D). Totuși, coeficienții Hill individuali corespunzători au variat de la 3.7-4.0 (albastru) la 6.9-7.4 (verde/galben) și 2.7-2.8 (roșu) (Tabel 2). Toate aceste cifre substanțiază ideea că aranjamentul structural dominant al Complexului I în celulele Jurkat este forma dimerică, care leagă cooperativ două molecule de ROT, și că o contribuție semnificativă provine, de asemenea, de la Complexul I tetrameric, în care cel puțin trei molecule de rotenon (mai probabil patru) se leagă la situsul 1 ROT într-o manieră cooperativă. O inspecție rapidă a domeniilor spectrale ale DL permite obținerea unor informații relevante privind frecvența relativă a dimerilor și tetramerilor Complexului I.

Tabel 2. Parametrii derivați din fitul dependenței produsului cuantic al DL de $[NADH]_m$ and $[FMN_{ox}]$ relativ

Parametru	Produsul cuantic al DL (VIS)	Produsul cuantic al DL (albastru)	Produsul cuantic al DL (verde/galben)	Produsul cuantic al DL (roșu)
NADH				
Y_0	0.446	0.130	0.174	0.142
Y_{max}	21.0	6.11	8.21	6.68
K_d	2.92	2.95	2.37	4.15
h	4.26	3.98	7.42	2.84
FMN_{ox}				
Y_0	0.473	0.138	0.185	0.150
Y_{max}	21.0	6.11	8.21	6.68
K_d	2.65	2.79	2.19	4.01
h	4.39	3.68	6.94	2.66

Astfel, datele DL indică faptul că emisia de lumină verde/galbenă (asociată probabil cu Complexul I tetrameric) contribuie cu 39%, și emisia de lumină albastră și roșie (asociată cu forma dimerică a Complexului I) contribuie cu 61% la DL total. Prin urmare, rezultatele noastre sugerează că cca. 60% și respectiv 40% din oligomerii Complexului I în celulele Jurkat cells sunt în formă dimerică, respectiv tetramerică.

În concluzie, în baza rezultatelor noastre curente principale și anume: 1) DL este strâns legată de nivelul de FMN oxidat, care se găsește mai ales în mitocondrii [22], 2) DL este, de asemenea, legat de nivelul de NADH, substratul Complexului I mitocondrial, 3) ROT, un inhibitor specific al Complexului I, a afectat considerabil DL, și 4) MD și QC, care interacționează robust cu Complexul I, au afectat, de asemenea, semnificativ DL, toate rezultatele noastre întăresc ideea [26] că Complexul I mitocondrial joacă un rol major în fotoemisia întârziată ultra-slabă indusă de fotoni în celulele Jurkat.

Alte detalii se găsesc în raportul *in extenso* și în **publicația trimisă la o revistă ISI (aflată în revizie) [23].**

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE SELECTIVE

1. X. Xu, E.A. Arriaga, Qualitative determination of superoxide release at both sides of the mitochondrial inner membrane by capillary electrophoretic analysis of the oxidation products of triphenylphosphonium hydroethidine, *Free Rad. Biol. Med.* 46 (2009) 905-913.
2. N. Li, K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, J.P. Robinson, Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8516-8525.
3. S.P.J. Albracht, A.J. Meijer, J. Rydström, Mammalian NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) together regulate the mitochondrial production of H_2O_2 - implications for their role in disease, especially cancer, *J. Bioenerg. Biomembr.* 43 (2011) 541-564.
4. H. Suzuki, T.E. King, Evidence of an ubisemiquinone radical(s) from the NADH-ubiquinone reductase of the mitochondrial respiratory chain, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 352-358.
5. V.G. Grivennikova, E.O. Maklashina, E.V. Gavrikova, A.D. Vinogradov, Interaction of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase with rotenone as related to the enzyme active/inactive transition, *Biochim. Biophys. Acta* 1319 (1997) 223-232.
6. S. Magnitsky, L. Touloukhonova, T. Yano, V.D. Sled, C. Hägerhäll, V.G. Grivennikova, D.S. Burbaev, A.D. Vinogradov, T. Ohnishi, EPR characterization of ubisemiquinones and iron-sulfur cluster N2, central components of the energy coupling in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in situ, *J. Bioenerg. Biomembr.* 34 (2002) 193-208.
7. S.T. Ohnishi, T. Ohnishi, S. Muranaka, H. Fujita, H. Kimura, K. Uemura, K. Yoshida, K. Utsumi, A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria, *J. Bioenerg. Biomembr.* 37 (2005) 1-15.
8. N. Li, K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J.A. Melendez, J.P. Robinson, Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8516-8525.

9. J.S. Isenberg, J.E. Klaunig, Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells. *Toxicol. Sci.* 53 (2000) 340-351.
10. W. Yin, X. Li, S. Feng, W. Cheng, B. Tang, Y.L. Shi, Z.C. Hua. Plasma membrane depolarization and Na,K-ATPase impairment induced by mitochondrial toxins augment leukemia cell apoptosis via a novel mitochondrial amplification mechanism, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 191-202.
11. S. Matzno, Y. Yamaguchi, T. Akiyoshi, T. Nakabayashi, K. Matsuyama, An attempt to evaluate the effect of vitamin K₃ using as an enhancer of anticancer agents, *Biol. Pharm. Bull.* 31 (2008) 1270-1273.
12. I. Laux, A. Nel, Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves Fas-dependent and Fas-independent pathways, *Clin. Immunol.* 101 (2001) 335-344.
13. J.J. Brière, D. Schlemmer, D. Chretien, P. Rustin, Quinone analogues regulate mitochondrial substrate competitive oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 1138-1142.
14. M. Floreani, F. Carpenedo, One- and two-electron reduction of menadione in guinea-pig and rat cardiac tissue, *Gen. Pharmacol.* 23 (1992) 757-762.
15. P.J. O'Brien, Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity, *Chem. Biol. Interact.* 80 (1991) 1-41.
16. J. Shen, N. Khan, L.D. Lewis, R. Armand, O. Grinberg, E. Demidenko, H. Swartz, Oxygen consumption rates and oxygen concentration in Molt-4 cells and their mtDNA depleted (ρ^0) mutants, *Biophys. J.* 84 (2003) 1291-1298.
17. C. Sandoval-Acuña, C. Lopez-Alarcón, M.E. Aliaga, H. Speisky, Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action, *Chem. Biol. Interact.* 199 (2012) 18-28.
18. I. Baran, 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. Phys.* 56 (2011) 388-398.
19. I. Baran, C. Ganea, S. Privitera, A. Scordino, V. Barresi, F. Musumeci, M.M. Mocanu, D.F. Condorelli, I. Ursu, R. Grasso, M. Gulino, A. Garaiman, N. Musso, G.A.P. Cirrone, G. Cuttone, Detailed analysis of apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T cells after proton-irradiation and treatments with oxidant agents and flavonoids, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012) 498914:14
20. I. Baran, E. Katona, C. Ganea, Quercetin as a fluorescent probe for the ryanodine receptor activity in Jurkat cells, *Pflügers Arch.* 2013, DOI: 10.1007/s00424-013-1235-y, 465:1101–1119
21. A. Mayevsky, G.G. Rogatsky, Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292 (2007) C615-C640.
22. L.D. Gaspers, A.P. Thomas, Calcium-dependent activation of mitochondrial metabolism in mammalian cells, *Methods* 46 (2008) 224-232.
23. Irina Baran, Diana Ionescu, et al., Mitochondrial respiratory Complex I probed by delayed luminescence spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 2013, (trimisă, sub revizie)
24. H. Suzuki, T.E. King, Evidence of an ubisemiquinone radical(s) from the NADH-ubiquinone reductase of the mitochondrial respiratory chain, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 352-358.
25. A.D. Vinogradov, V.G. Grivennikova, The mitochondrial Complex I: progress in understanding of catalytic properties, *IUBMB Life* 52 (2001) 129-134.
26. 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, Effects of menadione, hydrogen peroxide and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells, *Cell Biochem. Biophys.* 58 (2010) 169-179.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Articole ISI

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 (IF:3.393, is 0.691)
2. Irina Baran, Eva Katona, Constanta Ganea, Quercetin as a fluorescent probe for the Ryanodine receptor activity in Jurkat cells, *Pfluegers Archiv, European Journal of Physiology*, 2013, DOI 10.1007/s00424-013-1235-y, 465:1101–1119, (IF 4.866, is. 1.8227)
3. Irina Baran and Constanta Ganea, RyR3 in situ regulation by Ca²⁺ and quercetin and the RyR3-mediated Ca²⁺ release flux in intact Jurkat cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2013, (acceptat)(IF. 3.370, is 1.112)
4. M.M. Mocanu, M. Surcel, C. Ursaciuc, E. Katona, C. Ganea, Antiproliferative effect of quercetin in mammary and epidermoid cancer, **ROMANIAN BIOTECHNOLOGICAL LETTERS**, 2013, acceptat (IF. 0.363, is. 0.115)
5. Irina Baran, Diana Ionescu, Maria Magdalena Mocanu, Adrian Iftime, Ioana Teodora Tofolean, Ruxandra Irimia, Alexandru Goicea, Alexandru Dimancea, Andrei Neagu, Constanta Ganea, Novel insights into the antiproliferative effect of quercetin, menadione and rotenone in human leukemia Jurkat T cells, *Leukemia Research*, 2013 (trimisă, sub revizie)(IF: 2.764, is 1.006)

6. Irina Baran, Diana Ionescu, Simona Privitera, Agata Scordino, Maria Magdalena Mocanu, Francesco Musumeci, Rosaria Grasso, Marisa Gulino, Adrian Iftime, Ioana Teodora Tofolean, Alexandru Garaiman, Alexandru Goicea, Ruxandra Irimia, Alexandru Dimancea, Constanta Ganea, Mitochondrial respiratory Complex I probed by delayed luminescence spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics*, 2013, (trimisă, sub revizie) (IF. 2.881, is 2.107)
7. M.M. Mocanu, C. Ganea, et al., Epigallocatechin-gallate determines ErbB proteins downregulation, cell death mediated by 67kDa laminin receptor and altered lipid order in mammary and epidermoid carcinoma cells, *J. NAT. PROD.*, (trimisă, in revizie)(IF. 3.285, is. 1.867)

Conferințe

1. Ganea C. ; Katona, E.; Baran, I., Quercetin activates the RyR3 receptor in Jurkat human leukemia cells, conferință invitată, Max Planck Institut for Biophysics, Frankfurt/Main, Germania, 28 oct. 2011
2. Baran, I.; Katona, E.; Ganea, C., Quercetin fluorescence reveals the open probability of the RyR3 Ca²⁺ channel in intact cells, 22nd IUBMB Congress/37th **FEBS**, Seville, SPAIN, SEP 04-09, 2012, **FEBS JOURNAL** Volume: 279 Special Issue: SI Suppl: 1, p: 269-270, SEP 2012
3. Ionescu D., Ganea C, Iftime A., Tofolean I., Irimia R., Goicea A., Dimancea A., Neagu A., Baran I., Quercetin exerts its antitumoral effect while manifesting a strong antioxidant character, 9th EBSA European Biophysics Congress, Eur Biophys J (2013) 42 (Suppl 1):S1–S236
4. M.M. Mocanu, P. Nagy, L. Georgescu, T. Varadi, D. Shrestha, I. Baran, E. Katona, J. Szollosi, C. Ganea, The effect of flavonoids in mammary and epidermoid tumor cells with ErbB proteins overexpression, **8th International Conference "Structure and Stability of Biomacromolecules - SSB 2013"**, 2013, Kosice, Slovakia.
5. Ionescu D., The influence of quercetin on lipid membranes with cholesterol, **8th International Conference "Structure and Stability of Biomacromolecules - SSB 2013"**, 2013, Kosice, Slovakia.

Distincții:

Ca o recunoaștere internațională a valorii rezultatelor obținute, articolul științific publicat în revista cotate ISI **Pfluegers Archiv, European Journal of Physiology**, 2013, a primit distincția „**Global Medical Discovery**” la secțiunea „Key Scientific Articles” („Global Medical Discovery (ISSN 1929-8536) features breaking research judged to be of key importance in science and medicine”).