



UNIVERSITATEA „BABEŞ-BOLYAI”
CLUJ-NAPOCA
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



**Mecanisme de acțiune implicând metaloproteine, stres
oxidativ și nitrozativ și compuși cu activitate
antitumorală**

-Rezumatul tezei de doctorat-

Doctorand: **Cristina-Maria Bischin**

Conducător științific: **Prof. Dr. Ionel Haiduc**

CLUJ-NAPOCA – 2012



UNIUNEA
EUROPEANĂ



GUVERNUL
ROMÂNIEI
MINISTERUL
MUNCII, FAMILIEI
ȘI
PROTECȚIEI
SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social
European
POSDRU 2007-2013



Instrumente
Structurale
2007-2013



OIPOSDRU

MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI



UNIVERSITATEA
BABEȘ-BOLYAI
CLUJ-NAPOCA

Investește în oameni !

FONDUL SOCIAL EUROPEAN

Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013

Axa prioritară 1. Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere

Domeniul major de intervenție 1.5. Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării

Contract nr: POSDRU/88/1.5/S/60185: „STUDII DOCTORALE INOVATIVE ÎNTR-O SOCIETATE BAZATĂ PE CUNOAȘTERE”



UNIVERSITATEA „BABEȘ-BOLYAI”
CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Cristina-Maria Bischin

Mecanisme de acțiune implicând metaloproteine, stres oxidativ și nitrozativ și compuși cu activitate antitumorală

-Rezumatul tezei de doctorat-

Comisia de doctorat:

Președinte:

Prof. Dr. Florin Dan Irimie - Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Conducător științific:

Prof. Dr. Ionel Haiduc - Universitatea Babeș Bolyai, Cluj-Napoca

Membri:

Prof. Dr. Adriana Mureșan - Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, Cluj-Napoca

Prof. Dr. Zeno Gârban - Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului, Timișoara

Conf. Dr. Radu Silaghi-Dumitrescu - Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca

Data susținerii publice: 12 noiembrie 2012

Cuprinsul tezei:

Cuprins	iii
1. Studiu de literatură.....	1
1.1. Stresul oxidativ și nitrozativ	1
1.1.1. Stresul oxidativ	1
1.1.2. Stresul nitrozativ	4
1.2. Complecși metalici cu activitate antitumorală.....	8
1.2.1. Rolul central al platinei	8
1.2.2. Studii structurale privind interacțiunea complecșilor platinici cu structuri proteice (peptide și proteine)	11
1.3. Efectele antioxidanților în toxicologia cisplatinului.....	21
2. Rezultate experimentale privind interacțiunea complecșilor platinici cu metaloproteine	23
2.1. Materiale și metode.....	23
2.2. Hemoglobina și compușii platinici. Rezultate experimentale.....	27
2.2.1. Influența cisplatinului asupra vitezei de autooxidare a hemoglobinei	27
2.2.2. Activitatea ascorbat peroxidazică a hemoglobinei în prezența cisplatinului.....	30
2.2.3. Efectul cisplatinului asupra afinității hemoglobinei față de oxigen.....	30
2.2.4. Reacția hemoglobinei cu azotitul în prezența compușilor antitumorali platinici	34
2.2.5. Inducerea peroxidării lipidelor de către hemoglobină în prezența cisplatinului.....	39
2.2.6. Determinarea radicalilor liberi în hemoglobina tratată cu cisplatin cu ajutorul tehnicii RES.	41
2.3 Mioglobina și compușii platinici.....	42
2.3.1. Viteza de autooxidare a mioglobinei în prezența cisplatinului.....	42
2.3.2. Activitatea peroxidazică a mioglobinei în prezența cisplatinului	43
2.3.3. Efectul cisplatinului asupra afinității mioglobinei față de oxigen	44
2.3.4. Inducerea oxidării lipidelor de către mioglobină în prezența cisplatinului	45
2.3.5. Experimente RES efectuate pe mioglobină în prezența cisplatinului.	46
2.4. Determinarea unor efecte ale cisplatinului asupra celulelor roșii.....	47
2.4.1. Introducere.....	47

2.4.2. Efecte de deteriorare a celulelor roșii observate cu ajutorul spectroscopiei UV-vis ...	47
2.4.3. Analiza fractală și morfometrică a celulelor roșii.....	51
2.5. Detectia directă și indirectă a radicalilor liberi induși de către cisplatin în culturi celulare de <i>E.coli</i>.....	54
2.5.1. Determinarea directă a radicalilor liberi induși de cisplatin în cultura de <i>E. coli</i>	54
2.5.2. Utilizarea capcanelor de spin pentru determinarea radicalilor liberi induși de cisplatin în cultura de <i>E. coli</i>	55
2.6. Concluzii.....	57
3. Complecși experimentali cu potențială activitate antitumorală	58
3.1. Coloranți cu unități fenotiazinice	58
3.1.1. Introducere.....	58
3.1.2. Materiale și metode.....	58
3.1.3. Rezultate experimentale	59
3.2. Derivați amino-fenotiazinici și analogi ai bazelor Troger	68
3.2.1. Introducere.....	68
3.2.2. Materiale și metode.....	68
3.2.3. Rezultate experimentale	69
3.3 Metalocomplex cu Sn (Fosfostanopropena)	72
3.3.1. Introducere.....	72
3.3.2. Materiale și metode.....	73
3.3.3 Rezultate experimentale	73
3.4. Concluzii.....	74
4. Activitatea peroxidazică a citocromului <i>c</i>.....	75
4.1. Studiu de literatură.....	75
4.1.1. Activitatea peroxidazică a citocromului <i>c</i> legat de membrană.....	78
4.1.2. Studii care vizează activitatea catalitică a citocromului <i>c</i>	79
4.2. Materiale și metode.....	80
4.3. Activitatea peroxidazică a citocromului <i>c</i>. Rezultate experimentale.	82
4.3.1. Studii de stabilitate ale citocromului <i>c</i> ; influența pH-ului și a clorhidratului de guanidină asupra stabilității.....	82
4.3.2. Activitatea ascorbat peroxidazică a citocromului <i>c</i>	88

4.3.3. Studii cinetice privind activitatea peroxidazică a citocromului <i>c</i> aflat în formă denaturată	90
4.4. Studiul reactivității citocromului <i>c</i> în prezența cisplatinului	99
4.4.1. Cisplatinul și metionina 80 a citocromului <i>c</i>	100
4.4.2. Acțiunea cisplatinului asupra activității ascorbat peroxidazice a citocromului <i>c</i>	101
4.4.3. Inducerea peroxidării lipidelor de către citocromul <i>c</i> în prezența cisplatinului	102
4.4.4. Detectarea radicalilor liberi cu ajutorul tehnicii RES în citocromul <i>c</i> supus tratamentului cisplatinic	104
4.5. Peroxidarea lipidelor de către citocromul <i>c</i> în prezența unor compuși experimentali activi biologic	105
4.5.1. Inducerea peroxidării lipidelor de către citocromul <i>c</i> în prezența derivaților amino-fenotiazinici și ai analogilor bazelor Troglér	105
4.5.2. Inducerea peroxidării lipidelor de către citocromul <i>c</i> în prezența unei fosfostanopropene.....	107
4.5. Concluzii.....	108
5. Concluzii generale.....	109
Referințe bibliografice:.....	110

Cuvinte cheie: *compus platinic, cisplatin, metaloproteină, hemoglobină, mioglobină,, citocromul c, celula roșie sangvină, toxicitate, radical liber, stres oxidativ, stres nitrozativ, peroxid, ascorbat*

Conținutul tezei

Capitolul 1

În prima parte a capitolului 1, este prezentată o scurtă introducere în subiectul stresului oxidativ și nitrozativ, cu accent pe chimia radicalilor liberi ai hemoproteinelor (hemoglobina și mioglobina), urmată de caracterizarea structurală a interacțiunii medicamentelor antitumorale pe bază de Pt cu proteine.

Cisplatinul și congenerii săi sunt cunoscuți pentru efectul lor terapeutic datorat legării de AND.¹ Necesitatea unor medicamente mai eficiente, precum și gama largă de efecte secundare care însoțesc tratamentul (greață, neuropatie periferică senzorială progresivă, vărsături, oboseală, alopecie, suprimare hematologică, leziuni renale), au alimentat de mai multe decenii interesul pentru înțelegerea mecanismelor complexe ale interacțiunii dintre cisplatin și congenerii săi, cu diferite biomolecule.^{2,3}

O observație importantă în acest sens este că cisplatinul se poate lega de o serie de proteine, fapt demonstrat de analiza elementală, cromatografie și spectrometrie de masă. Într-adevăr, a fost estimat că mai puțin de 5% din cisplatinul care intră în celule se va regăsi legat de AND; restul se va lega de proteine și peptide mici.⁴ După cum era de așteptat, cisplatinul preferă să se lege de grupările tiolice, glutationul și metalotioneina fiind ținte importante;⁵ de fapt, cisplatinul induce o creștere a nivelului grupărilor tiolice din celule, fiind, cel puțin în parte, responsabil de rezistența dezvoltată împotriva acestui medicament. Blocarea grupărilor tiolice favorizează *in vivo* legarea cisplatinului de ADN. Sulfur tiolice din metionină este, de asemenea, o țintă importantă, după cum o dovedește, printre altele, faptul că aducții Pt-metionină au fost detectați în urina pacienților tratați cu cisplatin.⁶

S-a dovedit formarea complexelor cisplatin-hemoglobină folosind concentrații clinice relevante pentru cisplatin și hemoglobină; un efect secundar observat ca urmare a legării platinei a fost eliberarea hemului. Hemoglobina este prezentă într-o concentrație mare în sânge și este deosebit de sensibilă la schimbări ale stării redox; în anumite condiții de stres, cum ar fi efortul fizic sau în anumite condiții fiziologice se angajează în reacții cu agenți ai stresului oxidativ, în primul rând cu peroxid-rezultând radicali liberi și fier hemic într-o stare înaltă de oxidare.^{7, 8, 9, 10}

Cu ajutorul spectrometriei de masă s-a demonstrat că cisplatinul se poate lega de mioglobină la reziduurile His116, Ser117, Lys118, and His119¹¹. Ca atare, se poate estima că hemoglobina și mioglobina ar putea fi sensibile la stresul impus de cisplatin, pacienților.¹²

Efectele secundare ale chimioterapiei, cum este toxicitatea indusă de cisplatin este, în parte, rezultatul formării radicalilor liberi ca superoxid și ionul hidroxil. Aceste specii foarte reactive de oxigen pot cauza distrugeri tisulare prin reacție cu toate moleculele biologice-lipide, proteine și acizi nucleici, ducând la formarea unor substanțe oxidate. De asemenea, radicalii liberi pot diminua nivelul glutationului liber și inhiba activitatea enzimelor antioxidante. Celula prezintă mecanisme enzimatice (glutathion, tioredoxină) și moleculare pentru a preveni integritatea membranelor biologice de procesele oxidative cauzate de radicalii liberi. Administrarea unor antioxidanți ca Vitamina E, Vitamina C, seleniu și carotenoide înainte sau după tratamentul pe bază de medicamente platinice este folosită pentru a proteja și ameliora nefrotoxicitatea la oameni și animale, fără a fi afectată activitatea anti-tumorală.¹³

Capitolul 2

În capitolul al II-lea, sunt arătate modalitățile prin care o serie de parametri fiziologici ai hemoglobinei și mioglobinei (cei mai mulți legați de reactivitatea radicalilor liberi), ca afinitatea față de oxigen, autooxidarea și reactivitatea prooxidantă față de peroxidul de hidrogen și azotit - măsurate cu ajutorul spectroscopiei UV-vis, sunt modulate de către cisplatin.

Aceste modificări sunt, de asemenea, observate în celula eritocitară, acestea fiind atenuate de antioxidanți. Au fost folosite metode computaționale pentru analiza formei celulelor, acestea fiind utile pentru cuantificarea similarității și a diferențelor dintre imaginile celulelor roșii expuse la cisplatin sau la soluție control fără cisplatin. Astfel, metodele morfometrice și de analiză fractală folosind metoda standard box-counting pentru caracterizarea formei imaginilor digitale individuale ale celulelor roșii tratate cu cisplatin, susțin concluziile spectroscopice.

De asemenea, spectrele obținute cu ajutorul rezonanței electronice de spin (RES) ilustrează, pentru prima dată, detecția unui radical liber în celula de *E. coli* expusă la cisplatin, precum și detectarea indirectă a unui radical asemănător, folosind o capcană de spin. Aceasta subliniază faptul că medicamentele pe bază de platină sunt o sursă de dezechilibru în metabolismul radicalilor liberi din interiorul celulelor vii, care pot avea implicații în efectele secundare suportate de pacienți în cazul utilizării lor.

Se poate specula că efectele secundare ale cislatinului pot fi datorate, în parte, intensificării stresului oxidative și nitrozativ. Rămâne de văzut, în ce măsură efectul benefic al acestui compus implicat în chimia AND-ului este afectat de interacțiunile sale cu proteinele heminice și cu alte proteine.

Capitolul 3

Încă din 1883, de când a fost sintetizată pentru prima dată fenotiazina de către Berthensen, derivații acesteia sunt folosiți în multe aplicații cum ar fi chimia coloranților, chimia farmaceutică, ca aditivi pentru lubrifianți, polimeri și multe altele.^{14, 15} Aplicațiile farmacologice ale acestor compuși sunt datorate în cea mai mare măsură cationului radical stabil care se formează pe această unitate heterociclică¹⁶.

Au fost sintetizați recent în laboratoarele de chimie organică ale Facultății de Chimie și Inginerie Chimică (UBB, Cluj-Napoca) o serie de coloranți prin condensarea 3-formil-10-alchil fenotiazinei cu metil-piridină, într-un mediu bazic. Compușii au fost investigați prin analize spectroscopice: UV-vis, fluorescență, RMN, FTIR și spectrometrie de masă și vor fi testați pentru abilitatea lor de a fotoactiva virusurile în suspensii de celule roșii, datorită formării oxigenului singlet.

De asemenea, s-a preparat pentru prima dată o serie de aminofenotiazine, prin aminarea catalitică a halogenofenotiazinelor în prezența microundelor, acestea fiind folosite ca material de bază pentru sinteza unor noi fenotiazine, analoage ale bazelor Troger. Aceștia din urmă sunt considerați precursori moleculari promițători pentru noi materiale funcționale. Studii de biologie moleculară efectuate în prezent urmăresc posibilitatea intercalării acestora în AND.

Un compus anorganic cu Sn a fost sintetizat în laboratorul de chimie anorganică, și a fost caracterizat cu ajutorul tehnicilor RMN și GS-Ms. Compusul a fost sintetizat cu scopul de a fi investigat pentru activitatea sa biologică.

În capitolul III, a fost descrisă influența acestor compuși experimentali, nou sintetizați, asupra vitezei de autooxidare a hemoglobinei și mioglobinei. Ambele proteine sunt influențate de stresul determinat de radicalii liberi, aceștia (superoxidul, peroxilul, peroxizii) fiind implicați în accelărarea autooxidării proteinei.

Coloranții fenotiazinici prezintă un efect măsurabil asupra vitezei de autooxidare a hemoglobinei și mioglobinei, accelărând procesul în modalități similare, în ambele proteine. Totuși, efectul observat în soluție în cazul proteinelor purificate este mai mic în comparație cu cel măsurat direct pe sânge, unde a fost monitorizat la fel ca în cazul hemoglobinei. Faptul că tendința și magnitudinea măsurată în sânge nu este aceeași cu cea în cazul hemoglobinei pure sugerează că acești compuși au capacitatea de a reacționa cu mai mult de o proteină, modulând capacitatea prooxidantă pe mai multe căi. Cu ajutorul spectroscopiei UV-vis și RES și a spectrometriei de masă, a fost detectat un intermediar de reacție (radical cation) care se formează în timpul oxidării unităților fenotiazinice ale coloranților, în prezența unei proteine din clasa peroxidazelor.

Derivații aminici au un efect puternic asupra vitezei de autooxidare a hemoglobinei și mioglobinei, accelărând procesul în modalități similare în ambele proteine. Pe de altă parte, Bazele Troger corespunzătoare au demonstrate un efect redus, chiar neglijabil.

Compusul cu Sn are un efect mic, chiar neglijabil, asupra vitezei de autooxidare a hemoglobinei și mioglobinei. Un efect ușor prooxidant este indus în cazul hemoglobinei. Pe de altă parte, compusul inhibă ușor autooxidarea mioglobinei, jucând, în acest caz, rolul unui antioxidant.

Capitolul 4

Pe lângă rolul său esențial de a transporta electroni, este cunoscut faptul că citocromul *c* se implică în apoptoză, unde eliberarea sa din mitocondrie este un pas cheie. Reactivitatea citocromului *c* în prezența radicalilor liberi, în special interacțiunea sa cu peroxidul, a fost propusă ca fiind relevantă pentru apoptoză. A fost arătat faptul că cel de-

al șaselea ligand al fierului heminic al acestei proteine, o metionină, în anumite condiții ca modificări ale pH-ului și ale temperaturii, poate disocia tranzitoriu, ușurând legarea peroxizilor la hem. Rezultatul interacțiunii citocromului *c* cu fosfolipidul mitocondrial specific, cardiolipina, este un complex care acționează ca un prooxidant specific și puternic. Legarea de fosfolipidele anionice cauzează schimbări conformaționale ale proteinei și perturbarea legăturii coordinative S-Fe, între Met₈₀ și fierul heminic, transformând citocromul *c* dintr-o proteină transportatoare într-o peroxidază prooxidantă care are un rol important în procesul apoptotic.¹⁷

În capitolul IV este arătat faptul că tratamentul care favorizează eliberarea celei de-a șasea poziție de coordinare la fierul heminic al citocromului *c*, crescând astfel accesibilitatea peroxizilor (prin denaturarea parțială cu clorhidrat de guanidină), conduce la o creștere drastică a reactivității acestei proteine față de peroxidul de hidrogen; activitatea ascorbat peroxidazică demonstrată aici pentru citocromul *c* nativ fiind drastic îmbunătățită (în termenii K_m and V_{max}) după denaturarea parțială cu clorhidrat de guanidină. Mai mult, cu ajutorul spectroscopiei stopped-flow UV-vis, după tratamentul cu peroxide al citocromului *c* denaturant cu guanidină, a fost detectat un intermediar de reacție, care seamănă cu spectrul Compusului II al globinelor, fiind propus a fi fierul - o specie de valență înaltă - prima dată detectată în cazul citocromului *c* la temperatura camerei.¹⁸ Deducem de-aici, că agenții care modifică structura proteinei (posibil medicamentele studiate de noi) ar putea măări gradul de accesibilitate al fierului.

Similar cu ceea ce a fost observat anterior și în cazul altor proteine heminice,^{19, 20,} ²¹ citocromul *c* poate induce autooxidarea lipidelor dintr-un sistem lipozomal, acest proces fiind dependent de concentrația de cisplatin. Mecanismul propus implică formarea radicalilor liberi și acțiunea acestora asupra peroxizilor organici; a fost propus faptul că forma protonată a fierului ($Fe^{4+}-OH$)^{7, 22} este principala specie responsabilă pentru activitatea lipid-peroxidazică a acestor proteine heminice. Comportamentul antioxidant al compusului cu Sn a fost observat și în acest caz, în experimentele cu lipozomi, unde prezența sa inhibă peroxidarea lipidelor de către citocromul *c*. De asemenea, o serie de amine și baze Troger inhibă peroxidarea lipidelor de către citocromul *c*.

Capitolul 5

În concluzie, toxicitatea complexilor antitumorali pe bază de metale este rezultatul, în parte, al inducerii stresului oxidativ și nitrozativ, pe mai multe căi specifice. În această lucrare, au fost evidențiate unele modalități prin care comportamentul a trei proteine heminice (hemoglobina, mioglobina și citocromul *c*) este influențat de prezența unor agenți antitumorali (cisplatinul) sau cu potențială activitate antitumorală. Sensibilitatea redox a acestor proteine face ca în anumite condiții de stres (fiziologic sau patologic) acestea să se implice în reacții cu diferiți agenți ai stresului oxidativ, în special peroxizi, cu formarea unor specii heminice aflate într-o stare superioară de oxidare. Atașarea complexilor metalici de suprafața proteinelor determină modificări ale lanțurilor proteice, care pot bloca sau, din contră, permite accesul mai ușor al peroxizilor la centrul hemic. O serie de antioxidanți naturali s-au dovedit eficienți în atenuarea efectelor prooxidante ale cisplatinului.

Evidențierea, în anumite condiții, a unui intermediar în reacția citocromului *c* cu peroxizii, aduce o dovadă în plus că pasul inițial al declanșării apoptozei, fenomen în care acesta este implicat, este reprezentat de un mecanism peroxidazic, în a cărui modulare un rol important îl poate avea ascorbatul.

Mai mult, o serie de experimente, *in vitro*, au evidențiat modalitatea în care întreg metabolismul radicalic al unei celule umane (celula roșie) sau simbiotice (*E. coli*) poate fi afectat de prezența cisplatinului.

Astfel, folosindu-se spectroscopiile UV-vis și RES, tehnicile stopped-flow, microscopia electronică, spectrometria de masă și cultura celulară *in vitro* s-au adus unele dovezi în plus despre modalitățile în care unii agenți antitumorali pot afecta organismul, aceste metode de investigare putând fi utile în viitor, pentru prezicerea toxicității unor compuși experimentali biologic activi.

Referințe bibliografice:

-
- ¹ Sherman, S.E., Lippard, S.J., Structural aspects of platinum anticancer drugs interactions, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 1153-1181;
- ² Peng, J., Mandal, R., Sawyer, M., Li, X-F., Characterization of intact hemoglobin and oxaliplatin interaction by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry, *Clin. Chem*, **2005**, 51, 2274-2281;
- ³ Mandal, R., Kalke R., Li, X-F., Interacion of oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin with Hemoglobin and the resulting release of a hem group, *Chem. Res. Toxicol.*, **2004**, 17, 1391-1397;
- ⁴ Cullen, K.J., Yang, Z., Schumaker, L., Guo, Z., Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2007**, 39, 43-50;
- ⁵ Hagrman, D., Goodisman, J., Soid, A-K., Kinetic study of the reaction of cisplatin with glutathion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, 308, 658-666;
- ⁶ Dabrowiak, J.K., Goodisman, J., Soid, A.-K., Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols, *Drug Met Rev.*, **2002**, 30, 1378-1384;
- ⁷ Silaghi-Dumitrescu, R., Reeder, B.J., Nicholls, P., Cooper, C.E., Wilson, M.T., Ferryl haem protonation gates peroxidatic reactivity in globins, *Biochem. J.*, **2007**, 403, 391-395;
- ⁸ Vollaard, N.B., Shearman, J.P., Cooper, C.E., Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance, *Sports Med.*, **2005**, 35, 1045-1062;
- ⁹ Vollaard, N.B., Reeder, B.J., Shearman, J.P., Menu, P., Wilson, M.T., Cooper, C.E., A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo, *Free. Radic. Biol. Med.*, **2005**, 39, 1216-1228;
- ¹⁰ Reeder, B.J., Svistunenko, D.A., Cooper, C.E., Wilson, M.T., The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology, *Antioxid. Redox Sign.*, **2004**, 6, 954-966;
- ¹¹ Zhao, T., King, F.L., A mass spectrometric comparison of the interaction of cisplatin and transplatin with myoglobin, *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 186-192;
- ¹² Bischin, C., Lupan, A., Taciuc V., Silaghi-Dumitrescu, R., Interactions between proteins and platinum-containing anti-cancer drugs, *Mini. Rev. Med. Chem.*, **2011**, 11, 214-224;
- ¹³ Bischin, C., Taciuc, V., Silaghi-Dumitrescu, R., Effects of antioxidants in cisplatin toxicology, *Metal Elements in Environememt, Medicine and Biology Tome X*, R.Silaghi-Dumitrescu, Gabriela Garban, Eds. **2010**, Eurobit Publishing House, 265-270;
- ¹⁴ Bernthsen, A., Heinrich Caro, *EurJIC*, **1912**, 45, 1987-2042;
- ¹⁵ Gupta, R.R., Phenothiazines and 1,4-benzothiazines Chemical and Biomedical Aspects, in *Bioactive Molecules*, **1988**, 4, ed. Elsevier ;

-
- ¹⁶ Lin, H-H, Chang, C-C., Spectroscopic investigations of vinyl-substituted 10H-phenothiazine *Dye. Pigments*, **2009**, 83, 230-236;
- ¹⁷ Kagan, V.E., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Jiang, J., Potapovich, A.I., Kini, V., Amoscato, A.A., Fujii, Y., Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine, *Free. Radic. Biol. Med.*, **2004**, 37, 1963-1985;
- ¹⁸ Bischin, C., Deac, F., Silaghi-Dumitrescu, R., Worrall, J. A., Rajagopal, B. S., Damian, G., Cooper, C. E., *Free Radic. Res.*, **2011**, 45, 439-444;
- ¹⁹ Moxness, M.S., Brunauer, L.S., Huestis, W.H., Hemoglobin oxidation products extract phospholipids from the membrane of human erythrocytes, *Biochemistry*, **1996**, 35, 7181-7187;
- ²⁰ Reeder, B. J., Wilson, M.T., Mechanism of reaction of myoglobin with the lipid hydroperoxide hdroperoxy octadecadienoic acid, *Biochem. J.*, **1998**, 330, 1317-23;
- ²¹ Reeder, B. J., Svistunenko, D. A., Sharpe, M. A., Wilson, M. T., Characteristics and mechanisms of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin, *Biochemistry*, **2002**, 41, 367-375;
- ²² Bayir, H., Kagan, VE., Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory, *Crit. Care*, **2008**, 12, 206-217.