

Radicali liberi in sisteme biologice; efectele lor citogenetice

ROZALIA NITU*, DELIA-IRINA COROL**, N. TOMA*

**Institutul de Genetica, Universitatea din Bucuresti, Aleea Portocalelor, nr. 1-3, sector 6, Bucuresti*

***Institutul National de C&D pentru Fizica si Inginerie Nucleara "Horia Hulubei", Bucuresti*

Ce sunt radicalii liberi?

Radicali liberi pot fi definiti ca atomi sau molecule ce contin in structura lor un electron neimperecheat. Acesti electroni au o energie ridicata ceea ce determina instabilitatea atomului / moleculei care ii contin. Starea de echilibru caracterizata de o energie mai scazuta deci de o stabilitate mai mare a moleculei se atinge prin punerea in comun / cuplarea electronilor neimperecheati cu grupari electrofile ale altor participanti la reactii.

1. Tipuri de radicali liberi

Varietatea radicalilor liberi existenti sau formati in natura ca urmare a multor procese (radiatii ultraviolete, gama, actiunea unor particule specifice, etc.) face clasificarea acestora extrem de dificila.

Din punct de vedere al naturii elementului care contine electroni neimperecheati, radicalii liberi pot fi clasificati in:

1. Radicali liberi ai oxigenului
2. Radicali liberi ai azotului
3. Compusi aromatici
4. Compusi de tip chinonic si semichinonic
5. Acizi nucleici
6. Radicalul thil

1. Radicali liberi ai oxigenului – factorul principal care determina cresterea intensitatii formarii radicalilor liberi este activarea oxigenului. Datorita prezentei acestui element nu numai in atmosfera, dar si in aproape toate substantele care compun organismul, interactia radicalilor liberi cu oxigenul este inevitabila.

Productia celulara a speciilor reactive ale oxigenului exista din amandoua sursele enzimatic si neenzimatic. Ca stari tarzii, orice transfer de electroni din proteine sau sistem enzimatic poate duce la formarea speciilor reactive ale oxigenului (SRO) ca produci ai reactiilor de transfer de electroni. Aceasta generare "neintentionata" a SRO in mitocondrii este apreciata pentru 1-2% din totalul O₂ consumat in conditii reducatoare. Potrivit concentratiilor crescute de superoxid dismutaza din mitocondrii, concentratiile intramitocondriale ale O₂ sunt mentinute constant la nivele scazute. Potentialul SRO in mitocondrii a mediat semnalizarea celulara. S-a sugerat ca factorul de necroza tumoral si interleukina 1 care induce apoptoza pot implica SRO provenite din mitocondrii. S-a sugerat ca mitocondriile pot functiona ca "O₂ senzor" mediind hipoxia indusa de gene transcriptionale.

Reticulul endoplasmatic (RE) este un alt organit intracelular marginit de membrana, care spre deosebire de mitocondrii, este principal implicat în biosinteza lipidelor și proteinelor. Reticulul endoplasmatic neted (REN) conține enzime care catalizează o serie de reacții de detoxificare a medicamentelor solubile în lipide și alți produși metabolici daunători. Cei mai studiați sunt citocromul p-450 și b5 din familia enzimelor care pot oxida acizii grași nesaturate și xenobioticele și reduc O_2 molecular pentru a produce O_2^{\cdot} sau H_2O_2 .

Peroxizomii sunt o sursă importantă de producere a H_2O_2 celular. Ei conțin numeroase enzime care generează H_2O_2 incluzând oxidaza glicolat, D-amino acid oxidaza, urată oxidaza. Catalaza peroxizomala utilizează H_2O_2 produs de către aceste oxidaze pentru a oxida alte substraturi diferite în reacții “peroxidative”. Aceste tipuri de reacții sunt importante în celulele ficatului și rinichiului în care peroxizomii distrug diferitele molecule toxice (incluzând etanol) care intră în circulație. O altă funcție importantă a reacțiilor oxidante care transporta în afara peroxizomii este oxidarea acizilor grași, care în celulele mamaliene se găsesc în mitocondrii și peroxizomi.

Pe lângă oxidazele asociate membranelor intracelulare, enzime solubile cum ar fi xantin oxidaza, aldehyd oxidaza, flavoprotein dehidrogenaza și triptofan dioxigenaza pot genera SRO în timpul ciclizării catalitice. Xantin oxidaza este în mare măsură utilizată la generarea O_2^{\cdot} in vitro pentru a studia efectul SRO în diverse procese celulare.

Oxidazele asociate membranei plasmatică au fost implicate ca surse ale factorului de creștere și/sau producerea oxidanților stimulați de citokine. Acest complex de enzime catalizează reducerea unui electron de la O_2 la O_2^{\cdot} . În timpul fagocitozei, membrana plasmatică este închisă ca un perete al veziculelor fagocitate. Aceste tinte eliberează O_2^{\cdot} și reactivează metabolitii interni pentru localizarea activității microbiale.

Oxigenul singlet (1O_2) - se obține prin reacții de oxido-reducere, descompunere sau radioliza. 1O_2 are un caracter electrofil, reactionând cu mulți compuși organici cum sunt acizii grași polinesaturați, colesterol, olefine formând hidroperoxizi sau cu compuși organici conținând atomi de S sau N producând oxizi. Dintre antioxidanți, α -tocoferolul, carotenii și bilirubina posedă capacitatea de a stinge oxigenul în stare de singlet.

Superoxidul ($O_2^{\cdot-}$) - acest radical constituie prima etapă a activării O_2 pe calea reducerii univalente și deci se formează prin captarea unui electron care se plasează pe unul din orbitalii n' de antilegatură.

Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) - adăugarea unui al doilea electron la $O_2^{\cdot-}$ produce ionul peroxid O_2^{2-} , care nu are electroni impari și nici caracter de radical liber. H_2O_2 se formează rapid prin reacțiile de dismutare ale $O_2^{\cdot-}$. Ca și O_2 , H_2O_2 este un agent oxidant slab, acționând mai ales asupra compusilor nesaturați (eteri) și triptofan. Principalele reacții ale H_2O_2 au loc cu ioni metalici. Dintre toate speciile reactive ale O_2 , H_2O_2 este cel mai stabil și mai ușor de măsurat.

Radicalul hidroxil (OH^{\cdot}) - alături de 1O_2 , radicalul OH^{\cdot} este cea mai puternică specie a O_2 . Radicalul OH^{\cdot} reacționează cu viteze mari cu absolut orice moleculă organică (RH) (glucide, aminoacizi, lipide, acizi nucleici, acizi organici).

Peroxizii - dintre toate speciile active ale oxigenului, peroxizii și produșii lor de descompunere sunt cei mai stabili și universal răspândiți. Peroxizii sunt veriga finală a activării O_2 . Peroxizii apar nu numai în organisme, dar și în obiectele din jur cum sunt plastice, cauciuc, vopsele, carburanți.

Ozonul (O_3) - este un alt radical liber al oxigenului, care la plante produce alterări caracteristice reacției de hipersensibilitate.

2. Radicali ai azotului (NO, NO₂)

Oxidul nitric (NO) este o moleculă unică (gazoasă) care acționează fie ca oxidant, fie ca reductor, în funcție de moleculele țintă. NO nu este o specie chimică agresivă așa ca el nu ataca moleculele la o rată semnificativă. Totuși NO poate fi ușor transformat într-o varietate

de molecule inrudite ca: -S-NO (S nitrozotiol), Fe-NO (nitrozil feric), NO₂ (nitrogen dioxid), peroxinitrit (ONOO⁻), NO₂⁻ (nitrat) si NO₃⁻ (nitrit). Cateva din acestea sunt mult mai puternice in atacul moleculelor biologice decat NO. In particular s-a sugerat că ONOO⁻ este o specie implicata in leziunile tisulare, aceasta distrugere fiind datorata puternicei sale actiuni oxidante.

NO este un radical mic, gazos, paramagnetic, care este usor solubil in apa, dar direct solubil in lipide. Aceste proprietati fizice ii permit sa difuzeze direct prin membranele biologice si explica rapida difuzie in afara circulatiei si in celule sau circulatia componentilor sanguini unde el poate media functiile citotoxice. NO se dizolva in sange si se leaga ireversibil la hemoglobina pe care o face foarte toxica daca este administrat in concentratii ridicate. NO este constant eliberat in timpul conditiilor bazice si sinteza NO este mai departe crescută de stimulii fizici si de numerosi compusi antagonisti (acetilcolina, serotonina).

S-a aratat ca NO joaca un rol important in functiile patofiziologice ale sistemului vascular. Se stia initial ca NO potenta vasodilatatia ca raspuns la activitatea ischemica. Totusi, experientele au aratat ca NO are numeroase functii: vasorelaxarea dependenta de endoteliu, inhibitia agregarii si adeziunea plachetelor, reducerea aderenței si agregarii neutrofilelor la endoteliul vascular. In plus, NO, ca un potential vasodilatator endogen, cauzeaza relaxarea musculaturii netede. S-a demonstrat, de asemenea, că NO inhiba sinteza ADN, functiile mitocondriilor si ale ribonucleotid reductazei.

Dereglarea producerii NO poate juca un rol in patogeneza catorva boli cardiovasculare incluzand: hipertensiunea, ateroscleroza, neoxigenarea post-ischemica, inflamatii acute si depresiile miocardice asociate cu socul septic.

3. Compusi aromatici – pe langa radicalii liberi de tip semichinonic, unii compusi aromatici pot fi antrenati in reactii cu producere de radicali cationici cu delocalizare electronica la atomul de azot. Astfel, o gama larga de fenoli produce radicali fenoxi (R-O[•]). O alta grupa de compusi aromatici, care produc radicali liberi in organism este constituita de 5-nitrofurani, 5-nitrotriazoli si 5-nitroimidazoli. Acesti compusi isi exercita activitatea citolitica in urma reducerii gruparii nitro de catre nitroreductaze. Din pacate, reducerea gruparii nitro favorizeaza formarea unor radicali liberi cu mare afinitate pentru legare de ADN.

4. Compusi de tip chinonic si semichinonic – flavin chinonele reprezinta o grupa din marea clasa a semichinonelor (SQ), care pot forma radicali liberi intermediari intre formele oxidate si cele reduse ale chinonelor. Chinonele sunt foarte raspandite in natura, in diferite stari redox, participand in procesele de transport electronic, cum sunt respiratia mitocondriala si fotosinteza. Au mai fost detectate chinone printre poluantii atmosferici, fumul de tigara si medicamente.

5. Acizi nucleici – radicalii liberi proveniti din acizi nucleici sunt cei mai interesanti. Acest domeniu este deosebit de fascinant, nu numai prin importanta deosebita a acizilor nucleici, ca substrat al transmisiei informatiei genetice si a proceselor biosintetice, ci si prin caracteristicile acestor radicali. Modificarile macromoleculelor de acizi nucleici rezulta in urma absorbtiei energiei radiante in fractiuni de secunda, rezultand excitari si ionizari. Daca moleculele excitate pierd energia absorbita tot in fractiuni de secunda, ionizarile sau scindarile produc radicali liberi cu viata mai lunga. Radicalii liberi ai acizilor nucleici rezulta deci prin impactul energiei absorbite (prin expunerea la radiatii ionizante sau UV) si care determina ruperea unor legaturi chimice, deteriorari ale unor componente (baze azotate).

6. Radicalul thiil – existenta radicalului thiil (RS[•]) a fost foarte mult timp controversata deoarece mult timp nu a putut fi evidentiat nici spectrofotometric si nici ca semnal RES. Ca si alti radicali liberi si radicalul RS[•] a fost formulat teoretic prin studiul semnalelor RES ale proteinelor si aminoacizilor iradiati in vitro.

2. Metode de detectie si cuantificare a radicalilor liberi

Exista o serie de metode masurare a radicalilor liberi, directe sau indirecte, utilizabile pentru sisteme simple de reactii. Printre metodele indirecte: a) *spectrofotometria* - este cea mai veche metoda, adesea este indispensabila identificarii unui radical liber din mai multe posibilitati de formare, utilizand reactivi specifici; metoda se bazeaza pe cuantificarea efectului de inhibitie pe care un radical liber il exercita fata de maximul de absorbtie al reactivilor specifici utilizati; b) *chemiluminiscenta* – insoteste de multe ori reactii sau procese generatoare de radicali liberi; c) *stingerea / inhibarea radiatiei de fluorescenta*. Metodele directe cauta sa inregistreze chiar radicalii liberi aparuti in cursul unei reactii si cuprind *rezonanta electronica de spin* (RES).

3. Surse de producere a radicalilor liberi

Deși oxigenul molecular este indispensabil pentru viata, in acelasi timp el are un efect negativ, cunoscut ca toxicitatea oxigenului, determinata de formarea unor specii reactive.

Exista un numar mare de surse endogene ale speciilor reactive ale oxigenului, dar si surse exogene care produc SRO, printre acestea incluzandu-se: smogul fotochimic, medicamentele anticanceroase, radiatiile ionizante si ultraviolete, existenta ionilor metalici tranzitionali (Fe, Mn, Pd).

Prin absorbtia luminii sau a radiatiilor ionizante se produc mari cantitati de radicali liberi. Actiunea ambilor agenti externi, desigur ca depinde de cantitatea si timpul expunerii. Daca actiunea luminii se produce, in special asupra unor substante cu structura favorabila absorbtiei fotonilor, radiatiile ionizante pot actiona direct asupra oricaror molecule din structura organismelor, producand radicali liberi prin deteriorarea lor. Radiatiile ionizante produc, insa radicali liberi si dupa incetarea expunerii prin efect indirect, datorita radiolizei apei.

Reactiile enzimatiche din organism constituie o sursa nepuizabila de radicali liberi intermediari, care reactioneaza intre ei sau cu alte substante producand compusi stabili.

O alta sursa de producere a radicalilor liberi o constituie metabolizarea unor compusi organici. De exemplu, o serie de hidrocarburi cancerigene (benzopiren, metilcolantren) patrunse in organism ca poluanti produc radicali liberi prin metabolizare.

Toate organismele sunt expuse la boli si sunt puternic adaptate la conditiile nefavorabile. In acest context, plantele, animalele si organismele mici sunt inrudite intre ele. Atat bolile cat si adaptarile la mediul inconjurator sunt legate frecvent de alterarea metabolismului chimic al oxigenului caracterizat prin tranzitia de la heterolitic (2 electroni atrasi sau cedati) pana la cresterea proceselor homolitice (1 electron tranzitat). Reactiile homolitice produc radicali care pot reactiona in mod agresiv deteriorand compartimente celulare, tesuturi si organisme. De aceea, aceste reactii generand specii reactive ale oxigenului sunt contrabalansate, in general, de cresterea interna a proceselor oxidative sau de ajutorul medicamentos extern.

Unele din mecanismele care genereaza radicali liberi in tesuturile biologice sunt: xantin oxidaza, activarea neutrofilelor, donarea directa a electronilor din lantul transportor de electroni de la nivelul mitocondriilor (regiunile NADH dehidrogenaza, ubiquinona) la oxigenul molecular si la enzimele ciclo-oxigenaza si lipoxigenaza. Drogurile, de asemenea, cunoscute ca inducand formarea radicalilor liberi, reprezinta exemple de surse ale radicalilor liberi care induc distrugerile miocardice.

Radicalii liberi ai oxigenului pot apare in plante, fie in timpul unor procese fiziologice (ex. fotosinteza), fie ca o consecinta a unor factori de stress extern, ca de exemplu expunerea

la actiunea ozonului atmosferic sau in urma unor reactii chimice produse in plante ca urmare a tratamentului lor cu reactivi capabili de a produce acesti radicali liberi.

4. Mecanisme de actiune ale radicalilor liberi si mecanisme de aparare ale organismului impotriva lor

Concepte curente ale semnalizarii SRO pot fi impartite, in general, in doua mecanisme de actiune: 1) alterari in starea redox intracelulara si 2) modificari oxidative ale proteinelor.

- 1) Alterari in starea redox intracelulara - In comparatie cu mediul extracelular, citoplasma este mentinuta normal in conditii puternic "reducatoare". Aceasta este insotita de capacitatea "redox tampon" a tiolilor intracelulari, GSH si tioredoxinei (TRX). Amandoua aceste sisteme tiol se opun stressului oxidativ intracelular reducand H_2O_2 , superoxizii si peroxizii lipidici (reactii care sunt catalizate de peroxidaze).
- 2) Modificari oxidative ale proteinelor - SRO pot altera structura si functia proteinelor: modificand resturile aminoacizilor, inducand dimerizarea proteinelor si interactionand cu alte complexe metalice (Fe-S). Modificarile oxidative ale aminoacizilor din domeniul functional al proteinelor pot implica mai multe cai.

Componentele celulare tinte pentru actiunea radicalilor liberi includ lipidele (lipoproteine cu densitate mica), macromolecule cu structura complexa, proteinele si ADN-ul.

Pentru minimalizarea efectelor negative ale SRO, organismele sunt prevazute cu un sistem de apărare antioxidant foarte eficient. Compușii antioxidanți (vitamina E si C, acidul uric si β -carotenul) si enzimele antioxidante (superoxid dismutaza - SOD, catalazele, peroxidazele), agentii de chelatare ai metalelor cum ar fi transferina, lactoferina si ceruloplasmina functioneaza ca un sistem antioxidant prin legarea ionilor metalici potential daunatori. De aceea, leziunile celulare apar in conditiile in care rata formarii SRO este crescuta sau activitatea sistemului de aparare este deficitara, deci cand se creeaza un dezechilibru intre sistemele de protectie si sistemele de generare ale SRO.

Ca si la animale, la plante, radicalii liberi ai oxigenului intervin in diferite procese: aparare fata de atacul unor microbi, reactivitate fata de unii poluanti abiotici, declansarea unor semnale pentru diferentierea celulara, dezvoltare si apoptoza. Generarea unui exces de radicali liberi in plante, ca si la animale, este desemnata ca stress oxidativ. Unul din factorii cel mai des folositi in declansarea experimentala a stressului oxidativ, la plante, este ozonul. Este interesant de precizat ca reactivitatea plantelor la actiunea ozonului este asemanatoare cu fenomenul de hipersensibilitate la actiunea unor microbi. Printre plantele folosite in experientele de producere a stressului oxidativ, cu ajutorul ozonului, se numara *Arabidopsis thaliana* si *Betulla pendula*. Alte procedee experimentale de declansare a stressului oxidativ sunt: tratamentul fotodinamic al plantelor, tratamentul cu radiatii gama sau tratamentul cu un amestec de sulfat feros si clorura de aluminiu, tratamentele cu apa oxigenata si cu ierbicidul paraquat.

Sunt mai mult de 300 de teorii care explica fenomenul imbatranirii. Dintre toate teoriile, teoria radicalilor liberi in imbatranire, postulata pentru prima data de Harman, este cea mai intalnita si larg testata si este bazata pe natura chimica si prezenta permanenta a radicalilor liberi. In ambele cazuri ale lezarii ADN-nuclear, precum si cel mitocondrial, radicalii liberi induc stressul oxidativ in celule. Postulatul teoriei imbatranirii este bazat pe reactiile radicalilor liberi, implicate in producerea modificarilor datorate imbatranirii. Aceste modificari sunt asociate cu mediul inconjurator, boala si procesul imbatranirii intrinseci. Aceasta teorie este bazata pe natura chimica a reactiilor radicalilor liberi si omniprezenta lor (Holmes et al., 1992). Cel mai reactiv dintre toti radicalii liberi ai oxigenului este $OH\cdot$ care

reactioneaza rapid cu deoxiriboza si bazele ADN (von Sonntag, 1987). Doi produse de reactie ai OH[•] cu ADN servesc la cuantificarea deteriorarii ADN-ului: glicol timina si 8-hidroxideoxiguanina (8-OHdG). Aceste baze modificate sunt eliminate de catre enzimele reparatorii ale ADN.

Ca urmare a postulatului teoriei imbatranirii pot fi schitate doua concluzii majore asupra relatiei dintre deteriorarea ADN si maximul duratei de viata: a) agentii sau procesele de crestere a ratei de deteriorare a ADN si diminuarile repararii ADN-ului pot accelera viteza procesului de imbatranire, astfel scazand durata vietii (Weirich-Schwaiger, 1994); b) viteza de deteriorare aparenta poate scadea proportional cu scaderea vitezei metabolismului specific, descresterea suplimentului nutritional energetic (Higami et al., 1994).

Speciile reactive ale oxigenului sunt incriminate ca factori cauzatori ai dediferentierii celulelor deoarece: - SRO reactioneaza cu cromatina, modifica bazele ADN si cauzeaza rupturi ale catenei; - SRO induce aberatii cromozomale si viata lunga speciilor care au rata lenta de acumulare a aberatiilor cromozomale; - speciile cu viata lunga prezinta o rata scazuta in acumularea pigmentilor varstei, lipofuscina; - rata imbatranirii este proportionala cu rata metabolica pentru multe specii diferite.

Radicalii liberi au rol in deteriorarea mitocondriala si in senescenta permanenta (Harman, 1972). Rezultatele imbatranirii arata intr-adevar scaderea numarului de mitocondrii si ca organele din celulele imbatranite sufera alterari biochimice (Flohe, 1982).

Cateva studii au sugerat aceea ca ADNmt poate suferi o deteriorare oxidativa mai mare decat ADN nuclear (Yakes and Van Houten, 1997).

S-a presupus astfel, ca imbatranirea este cauzata de vatamarea ADNmt si peroxidarea lipidelor de catre radicalii liberi din membrana interna mitocondriala. Celulele replicate rapid nu permit atacul radicalilor liberi deoarece utilizeaza nivele scazute de oxigen (Bagchi et al., 1995; Richter, 1995). Mitocondriile de la speciile cu viata scurta genereaza cantitati mari de specii reactive ale oxigenului fata de speciile cu viata lunga. Deteriorarea ADNmt poate bloca turnover-ul mitocondrial si replicarea, cu deteriorarea concomitenta a membranei (proces de peroxidare).

Se poate considera partial ca mitocondria serveste in calitate de tinta majora de actiune a speciilor reactive ale oxigenului in tesuturile imbatranite. Ca mecanism de aparare a organismelor vii, impotriva imbatranirii il constituie experimentele care au demonstrat un efect de prevenire a deteriorarii oxidative legate de varsta, exercitat de Cu, Zn superoxid-dismutaza.

Un alt mecanism de actiune il constituie atacul speciilor reactive ale oxigenului la proteine, direct sau indirect (datorita peroxidarii lipidelor) rezultand din stimularea sau inhibarea activitatii enzimatice. Modificarea capacitatii de transport a proteinelor din membrane conduce la alterarea nivelului calciului existent intracelular si afecteaza nivelele de potasiu din metabolismul celular.

La nivel membranal un important agent de "aparare" impotriva stressului oxidativ il constituie coenzima Q (ubiquinona) care este gasita in membranele plasmatiche, in toate membranele intracelulare si in lipoproteinele cu densitate mica. Se gaseste in cantitati mari in membranele aparatului Golgi si in membranele lizozomale. Modul de actiune al coenzimei Q depinde de rolul pe care aceasta il are la nivel celular, putand fi: purtator / transportor de electroni; acceptor de electroni sau transportor de protoni. In functie de acest rol coenzima Q actioneaza specific la nivelul lantului respirator.

Cancerul si imbatranirea, doua consecinte biologice cu etiologie complexa, de asemenea pot fi functia altor tipuri endogene de deteriorare a ADN-ului. In ciuda reparatiei enzimatice si a altor procese de aparare, deteriorarea ADN-ului continua progresiv cu schimbarile secventelor genomice, indicand imbatranirea si conduce la dezvoltarea cancerului cu activarea oncogenelor sau inactivarea genelor supresoare. In consecinta, probabilitatea

mutatiilor si dezvoltarea concomitenta a tumorilor, precum si reducerea la maxim a duratei de viata au crescut rata oxidativa a deteriorarii ADN.

In ciuda complexitatii procesului de imbatranire, relativ cateva mecanisme influenteaza puternic rata imbatranirii. Acest concept formeaza bazele longevitatii determinand ipotezele imbatranirii care poate spune ca: 1) ori celulele dediferentiate reprezinta procesul primar de imbatranire; 2) ori SRO cauzeaza dediferentierea si 3) ori mecanismele active stabilizeaza starea potrivita a diferentierii, asa cum antioxidantii reprezinta clasa determinantilor longevitatii.

Speciile reactive ale oxigenului sunt cunoscute a fi implicate in diferite mecanisme pro- si anticarcinogene. Oricum, influenta lor in procesul de intretinere a transformarii fenotipului nu a fost bine studiat pana in prezent. Radicalii liberi ai oxigenului au fost considerati ca mediatori patologici importanti in multe tulburari clinice.

S-a constatat ca tratamentul cu doze mari de radiatii gama al plantelor a produs trichoame noi pe suprafețele adaxiale ale frunzelor mature deja expandate. Acest fenomen este dependent de varsta frunzelor si de dozele de radiatii. S-a gasit ca doua frunze expandate dupa iradiere au prezentat cea mai mare inductibilitate a trichoamelor. Tratamentele cu captori de radicali liberi ai oxigenului au anulat fenomenul. In acest caz, este vorba de inducerea anumitor gene cu rol in diferentierea celulara prin intermediul radicalilor liberi ai oxigenului, produși prin radioliza apei de catre radiatiile gama. Aluminiul si ionul feros administrati separat s-au dovedit a nu fi toxici in cazul aplicarii lor separate in culturile celulare de tutun. Totusi, administrati in combinatie au produs peroxidarea lipidelor membranare si pierderea viabilitatii celulare.

Tratamentul cu ozon al plantelor produce alterari caracteristice reactiei de hipersensibilitate (care este o forma cunoscuta a apoptozei) si anume: acumularea de compusi fenolici fluorescenti, fragmentarea ADN nuclear, condensarea cromatinei si fragmentarea nucleara. Aparitia acestor markeri in leziunile induse dupa o expunere acuta la ozon indica natura programata a acestor fenomene. In reactia de hipersensibilitate, au loc in mod corelat, apoptoza si procesele de aparare ale plantei prin producerea de radicali liberi ai oxigenului. S-a demonstrat prezenta radicalului liber anion superoxid in tesutul sanatos al plantei, adiacent leziunilor produse de ozon, in timpul extinderii leziunilor. In plus fata de aceasta, demonstrarea implicarii radicalilor liberi ai oxigenului in fenomenul prezentat a fost efectuata prin anulara reactiei de hipersensibilitate, prin inhibarea activitatii NADPH oxidazei, enzima cheie in producerea radicalilor liberi ai oxigenului in membranele celulare.

La animale, a fost demonstrat faptul, ca radicalii liberi ai oxigenului pot activa factorul de transcriptie NF κ B, ceea ce inseamna ca ei pot modula expresia anumitor gene printre care pe cele implicate in progresia in diferitele faze ale ciclului celular. Un fenomen analog ar putea avea loc la plante, prin implicarea antioxidantilor ascorbat si glutatation (care moduleaza actiunea radicalilor liberi ai oxigenului) in controlul ciclului celular al plantelor superioare.

5. Concluzii

Importanta radicalilor liberi poate fi inteleasa numai prin cunoasterea rolului lor. Radicalii liberi apar in anumite reactii de oxido-reducere in care au loc modificari structurale mari, de pe urma carora substanta respectiva isi schimba adesea functia biologica (devine mai hidrosolubila sau intervine in alt lant de reactii metabolice).

Prin formarea radicalilor liberi au loc modificari structurale rapide, schimbari functionale permitand implicarea lor in reactii multiple.

Pe cale evolutiva, natura a selectionat si inglobat in componenta organismelor, reactii generatoare de radicali liberi, cu roluri multiple: functionale, de comunicare intercelulare sau distructive, citolitice.

Daca la nivel molecular, principala tinta a radicalilor liberi sunt gruparile SH libere sau proteice, la cel celular, obiectivul major sunt membranele celulare.

Dupa cum s-a mentionat, radicalii liberi pot fi formati in organism, ca rezultat al activitatii metabolice endogene sau a asimilarii unor poluanti chimici, local, la nivelul celulelor dintr-un organ sau in mai multe tesuturi simultan sau treptat.

Datorita marii lor reactivitati, radicalii liberi au fost incriminati in foarte multe actiuni nocive organismului.

Bibliografie

1. ALVAREZ M.E., PENNELL R.I., MEIJER P.J., ISHIKAWA A., DIXON R.A., LAMB C. - Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784, 1998.
2. ASHOK B.T., RASHID A. - The aging paradox: free radical theory of aging. *Experimental Gerontology*, 1999, 34:293-303.
3. BAUD L., ARDAILLOU R. - Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 251: F765-F776, 1986.
4. BUTTERFIELD D.A., HOWARD D.J., YATIN S., ALLEN K.L., CARNEY J.M. - Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-phenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, pp. 674-678, January 1997.
5. CHANDEL N.S., MALTEPE E., GOLDWASSER E., MATHIEU C.E., SIMON M.C., SCHUMACKER P.T. - Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11715-11720, 1998.
6. FAULKNER K., FRIDOVICH I. - Luminol and lucigenin as detectors for O₂. *Free Radic Biol Med* 15: 447-451, 1993.
7. FINKEL T. - Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10: 248-253, 1998.
8. FRIDOVICH I. - Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112, 1995.
9. GOFF L.L., LAPEYRADE D., BOSSI A., NOEL-HUDSON M.S., BONALY J., WEPIERRE J. - Effect of biophysical changes on propidium iodide access to DNA during oxidative stress of cultured human skin cells. *Toxic. in vitro* vol. 6, no. 5, pp. 423-432, 1992.
10. GOLDMAN R., MOSHONOV S., ZOR U. - Generation of reactive oxygen species in a human keratinocyte cell line: role of calcium. *Arch Biochem Biophys* 350: 10-18, 1998.
11. HAROLD C., DAWIDZIK J.B., BUDZINSKI E.E. - Free radical-induced double lesions in DNA. *Free radical Biology and Medicine*, 2001, 31:856-868.
12. HIPPELI S., HEISER I., ELSTNER E.F. - Activated oxygen and free radicals in pathology: new insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37:3:167-178.
13. OLINESCU R. - Radicali liberi in fiziopatologia umana. Seria "Medicina". Editura Tehnica, Bucuresti, 1994.
14. SCHONEICH C. - Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Experimental Gerontology*, 1999, 34:I:19-34.
15. THANNICKAL V.J., FANBURG B.F. - Reactive oxygen species in cell signaling. Vol. 279, Issue 6, L1005-L1028, December 2000.