



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**Μελέτη της επίδρασης της γήρανσης και του
αντιοξειδωτικού τρογλιταζόνη στην οξείδωση κάλλων
Arabidopsis thaliana.**



ΠΜΣ «Βιοτεχνολογία και εφαρμογές στη γεωπονία»

ΒΑΣΙΛΗΣ ΤΣΕΚΟΥΡΑΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΠΜΣ «Βιοτεχνολογία και εφαρμογές στη γεωπονία»

«Μελέτη της επίδρασης της γήρανσης και του αντιοξειδωτικού τρογλιταζόνη στην οξείδωση κάλλων *Arabidopsis thaliana*.»

Μεταπτυχιακός φοιτητής Βασίλης Τσεκούρας

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπων: Κίντζιος Σπυρίδων

**Μέλη: Ρήγας Σταμάτιος
Λιακόπουλος Γεώργιος**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μορφολογίας και Φυσιολογίας Φυτών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, με επιβλέποντα τον καθηγητή κ.Κίντζιο Σπυρίδων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ.Κίντζιο, για όλη τη βοήθεια και συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής κ. Λιακόπουλο Γεώργιο και κ. Ρήγα Σταμάτιο.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία που είχαμε και ιδιαίτερα τις κυρίες Γεωργία Μοσχοπούλου και Κέλλυ Φλαμπούρη για την βοήθεια που μου παρείχαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και ιδιαίτερα τον Γιώργο Τσανικλίδη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	3
A. Εισαγωγή	4
A.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
A.2 Ιστοκαλλιέργεια και σχηματισμός κάλλων	5
A.3 Οξείδωση κυττάρων και σχηματισμός ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS)	7
A.4 Οξείδωση πρωτεϊνών και σχηματισμός καρβονυλίων.	9
A.5 Επίδραση τρογλιταζόνης στην οξείδωση κυττάρων.	11
B. Υλικά και Μέθοδοι	13
B.1 Ιστοκαλλιέργεια <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
B.2 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford	14
B.2.1. Αρχή της μεθόδου Bradford	14
B.2.2. Διαδικασία μέτρησης πρωτεϊνών	15
B.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων	18
B.4 Προσδιορισμός ελεύθερων ριζών ROS	21
Γ. Αποτελέσματα	22
Γ.1 Ολικές Πρωτεΐνες	22
Γ.1.1 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης	22
Γ.1.2 Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες	23
Γ.1.3 Επίδραση της τρογλιταζόνης στην ποσότητα πρωτεϊνών	26
Γ.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια	30
Γ.2.1 Επίδραση της τρογλιταζόνης στην ποσότητα πρωτεϊνικών καρβονυλίων.	32
Γ.3 Ελεύθερες Ρίζες	36
Γ.3.1 Επίδραση της τρογλιταζόνης στο σχηματισμό ROS	38
Γ.4 Μορφολογικές διαφοροποιήσεις κάλλων	41
Δ. Αποτελέσματα και Συζήτηση	43
E. Βιβλιογραφικές Αναφορές	48

Περίληψη

Στόχος του πειράματος είναι η μελέτη της επίδρασης των παραγόντων της γήρανση και της τρογλιταζόνης στο οξειδωτικό στρες των φυτικών κυττάρων. Καλλιεργήθηκαν κάλλοι *Arabidopsis thaliana*, δημιουργώντας μια χρονοσειρά ηλικιών δύο έως δώδεκα μηνών. Παράλληλα, κάλλοι δύο και τεσσάρων μηνών αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που είχε εμπλουτιστεί με τρογλιταζόνη, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 10nM και 10μM.

Για να εκτιμηθεί η επίδραση των δύο παραγόντων στις μεταβολικές διεργασίες, μετρήθηκε αρχικά η εξέλιξη της συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Εφαρμόστηκε η μέθοδος Bradford, στη χρονοσειρά κάλλων και σε αυτούς με την επίδραση τρογλιταζόνης. Στη συνέχεια, στο ίδιο φυτικό υλικό, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ομάδων καρβονυλίων, που αποτελεί πολύ καλό μέτρο για την εκτίμηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών. Η παρουσία ενεργών μορφών οξυγόνου, προσδιορίστηκε φθορισμομετρικά, με χρήση της χρωστικής 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA).

Ο παράγοντας ηλικία μελετήθηκε ως προς την ικανότητα βιοσύνθεσης πρωτεϊνών και στις οξειδωτικές διεργασίες. Παρατηρείται, ότι υπάρχει ένα κρίσιμο διάστημα μεταξύ του έκτου και όγδοου μήνα καλλιέργειας, όπου επηρεάζεται η ικανότητα βιοσύνθεσης πρωτεϊνών και η παρουσία καρβονυλίων σε αυτές. Η παρουσία ενεργών μορφών οξυγόνου αυξάνει σταθερά μέχρι τον όγδοο μήνα και στη συνέχεια σταθεροποιείται.

Η τρογλιταζόνη επιδρά ανάλογα με την ηλικία του κάλλου και η επίδραση αυτή εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της. Σε κάλλους δύο μηνών επιδρά θετικά στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και έχει αντιοξειδωτική δράση αφού εμφανίζονται μειωμένες ποσότητες καρβονυλίων και ROS, ειδικά όταν εφαρμόζεται η συγκέντρωση 10nM.

A. Εισαγωγή

Οι οξειδωτικές διεργασίες που συμβαίνουν στα φυτικά κύτταρα καθορίζουν μια σειρά από μεταβολικές διαδικασίες και σχετίζονται ακόμα και με τον κυτταρικό θάνατο. Αντικείμενο της μελέτης είναι, η διερεύνηση της επίδρασης των παραγόντων γήρανση και τρογλιταζόνη στο οξειδωτικό στρές των φυτικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό καλλιεργήθηκαν κάλλοι *Arabidopsis thaliana*, διαφόρων ηλικιών και υπό την επίδραση τρογλιταζόνης.

Ως οξειδωτικό στρες (oxidative stress) έχει οριστεί η διαταραχή στην ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (κυρίως ενεργών μορφών οξυγόνου, ROS) και στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Ταυτίζεται με μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών και ενζύμων τα οποία αποτελούν μέρος του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος. Επίσης παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα οξειδωτικών προϊόντων και μπορεί να οδηγήσει σε τραυματισμό των ιστών και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Οι ROS που παράγονται στα βιολογικά συστήματα είναι ικανές να προκαλέσουν εκτεταμένη καταστροφή σε αυτά, στοχεύοντας τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA. Αυτές οι αντιδράσεις μεταξύ των κυτταρικών συστατικών και των ελευθέρων ριζών οδηγούν σε καταστροφή των νουκλεϊκών οξέων, υπεροξειδωση λιπιδίων, οξείδωση των πρωτεϊνών, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων (μείωση της παροχής ενέργειας στο κύτταρο), καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργοποίηση ή αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, και τελικά σε κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται και στη διαδικασία της γήρανσης. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή (Harman, 1956) η γήρανση μπορεί να θεωρηθεί ως μία προοδευτική, αναπόφευκτη διαδικασία η οποία σχετίζεται με τη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών λόγω μιας ανισορροπίας στο σχηματισμό οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών.

A.1 *Arabidopsis thaliana*

Η *Arabidopsis thaliana* θεωρείται το καλύτερα χαρακτηρισμένο φυτό στη γη και οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη του γονιώματος. Είναι ένα μικρό ετήσιο ποώδες της οικογένειας Brassicaceae και έχει χρησιμοποιηθεί σε πειραματικές έρευνες εδώ και έναν αιώνα περίπου. Ο γενετικός του κώδικας έχει χαρακτηριστεί και σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος, το γρήγορο χρόνο ανάπτυξης και τη μικρή ποσότητα DNA που περιέχει, το καθιστούν εύκολο δείγμα για γενετική ανάλυση. Υπάρχει στενή ομοιότητα πολλών γονιδίων του *Arabidopsis*, με γονίδια σε είδη όπως το σιτάρι και το ρύζι, καθώς και πολλά μεμονωμένα γονίδια του, βρίσκουν αντιστοιχία με γονίδια που πραγματοποιούν την ίδια λειτουργία στα καλλιεργούμενα φυτά. Η αποκάλυψη της θέσης και της λειτουργίας γονιδίων του *Arabidopsis* συνεργεί στο να προσδιοριστούν γονίδια που ελέγχουν τις ίδιες διαδικασίες στα πιο σύνθετα καλλιεργούμενα φυτά. (Meinke et al, 1998)

Υπάρχει μεγάλη βιβλιογραφία με απόπειρες ιστοκαλλιέργειας του *Arabidopsis thaliana*, ήδη από τη δεκαετία του '60 (Loewenberg, 1965). Γενικά θεωρείται ένα φυτό που αντιδρά ικανοποιητικά στην *in vitro* καλλιέργεια και επιτυγχάνεται εύκολα η αναγέννηση φυτών από κάλλους. Η επιτυχία της καλλογένεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέσο ανάπτυξης, το φυτικό υλικό και τις φυτοορμόνες που εφαρμόζονται (Mathur et Koncz, 1998)

A.2 Ιστοκαλλιέργεια και σχηματισμός κάλλων.

Ο όρος Ιστοκαλλιέργεια ή καλλιέργεια *in vitro*, περιγράφει μια διαδικασία κατά την οποία μικρά τεμάχια φυτικού ιστού, όργανα ή κύτταρα, απομονώνονται από το μητρικό φυτό κάτω από ασηπτικές συνθήκες και καλλιεργούνται σε ειδικά δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα σε χώρους με ελεγχόμενο περιβάλλον (φωτισμός και θερμοκρασία). Το μικρό όργανο ή κομμάτι ιστού που απομακρύνεται από το μητρικό φυτό και από το οποίο πρόκειται να εγκατασταθεί όλη η καλλιέργεια *in vitro*, ονομάζεται έκφυτο.

Η καλλιέργεια ιστών *in vitro* δίνει τη δυνατότητα παραγωγής φυτικού υλικού, σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Δηλαδή τόσο το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας όσο και οι συνθήκες ανάπτυξης μπορούν να καθοριστούν και να παραμείνουν σταθερές για όλη τη περίοδο. Συνεπώς δίνεται η δυνατότητα να παραχθούν γρήγορα, εύκολα και σε ίδιες συνθήκες ο απαιτούμενος αριθμός ατόμων για τη διενέργεια μελετών.

Το θρεπτικό υπόστρωμα παρέχει όλες τις απαιτούμενες χημικές ουσίες για την ανάπτυξη και εξέλιξη φυτών, ιστών, κάλλων και πρωτοπλαστών. Ένα θρεπτικό υπόστρωμα αποτελείται από:

- Ανόργανα άλατα, τα απαραίτητα μακροστοιχεία, μικροστοιχεία και μία πηγή σιδήρου.
- Οργανικά στοιχεία, που καλύπτουν τις ανάγκες σε αμινοξέα και βιταμίνες
- Πηγή άνθρακα, συνήθως σουκρόζη.

Τα στοιχεία αυτά είναι τα βασικά χημικά συστατικά για την ανάπτυξη φυτικών κυττάρων, όμως ανάλογα με τον σκοπό της καλλιέργειας μπορεί να προστεθούν και άλλοι παράγοντες, ορμονικοί, που καθορίζουν την εξέλιξη της ανάπτυξης. Οι ορμόνες που εφαρμόζονται είναι αυξίνες, κυτοκινίνες, γιββερελλίνες, αμπισικό οξύ και αιθυλένιο. Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες είναι οι πιο διαδεδομένες και η αναλογία τους επηρεάζει σημαντικά την πορεία της καλλιέργειας. Υψηλή σχέση αυξίνης προς κυτοκινίνης επάγει την ανάπτυξη ριζών, ενώ η αντίστροφη σχέση οδηγεί σε βλαστογέννεση. Μια ενδιάμεση σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο ορμονών, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία κάλλων. (Smith, 2000)

Κάλλος, ορίζεται ένα συσσωμάτωμα από μη διαφοροποιημένα, ανοργάνωτα, αναπτυσσόμενα και διαιρούμενα φυτικά κύτταρα. Οποιοδήποτε τμήμα φυτικού ιστού, μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τη δημιουργία κάλλων, αν οι συνθήκες ανάπτυξης είναι κατάλληλες. Το πλεονέκτημα των κάλλων είναι ότι μπορεί να διατηρηθεί η ανάπτυξη τους σε μεγάλο βάθος χρόνου, υπό την προϋπόθεση ότι λαμβάνουν χώρα υποκαλλιέργειες, σε τακτά χρονικά διαστήματα, σε φρέσκο θρεπτικό μέσο ίδιας σύστασης.

Οι χειρισμοί του εκφύτου, η ρύθμιση της σύνθεσης του θρεπτικού υποστρώματος αλλά και των παραμέτρων του περιβάλλοντος καλλιέργειας, μπορούν να προσανατολίσουν την συμπεριφορά του προς ποικίλους δρόμους διαφοροποίησης, ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό. Στη παρούσα μελέτη, για να αποφευχθεί η

διαφοροποίηση και ο σχηματισμός εμβρύων, οι κάλλοι σχηματίστηκαν από σπόρους *Arabidopsis thaliana* που καλλιεργούνται σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με 2,25μM 2,4 D και 0,25μM kinetin (Valkenens et al, 1998).



Εικόνα 1: Κάλλος *Arabidopsis thaliana*

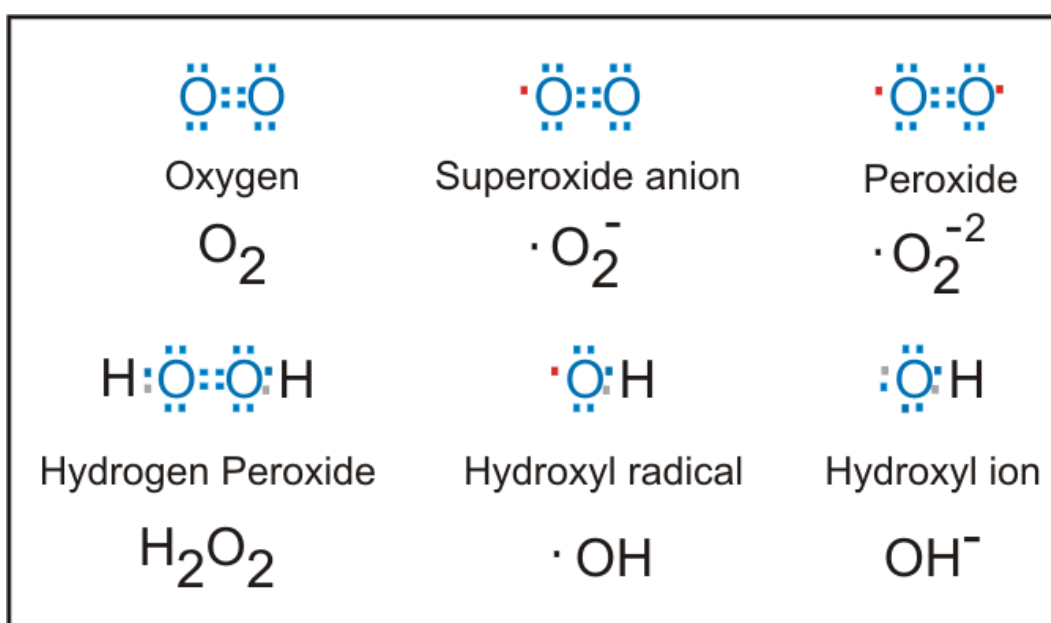
A.3 Οξείδωση κυττάρων και σχηματισμός ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS)

Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά, ασταθή μόρια, τα οποία φέρουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και είναι δυνατόν να βρίσκονται σε οξειδωμένη ή ανηγμένη μορφή. Η πλειοψηφία των ελευθέρων ριζών που προκαλούν βλάβη στα βιολογικά συστήματα είναι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS- reactive oxygen species).

Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο stress, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση. Οι βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου ασκούνται στα βιομόρια, στις πρωτεΐνες, στα νουκλεϊνικά οξέα, στα λιπίδια και μπορεί να

προκαλέσουν κυτταρική/ιστική βλάβη, από την οποία ο οργανισμός προστατεύεται με μια σειρά αντιοξειδωτικών ουσιών.

Οι ROS αποτελούν τα κύρια παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού στα κύτταρα. Η παραγωγή τους πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο O₂ κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Επιπλέον, παράγονται και ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού ξένων ουσιών καθώς και λόγω της έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) και η περίσσεια αλάτων. Προέρχονται από το μοριακό οξυγόνο (O₂) με διαδοχικές αντιδράσεις αναγωγής, και παρουσιάζονται στο πίνακα:



Εικόνα 2: Ηλεκτρονική δομή ελευθέρων ριζών οξυγόνου

Διακρίνονται οι ακόλουθές κατηγορίες :

- το ανιόν του σουπεροξειδίου (O₂⁻),
- το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)
- η ρίζα του υδροξυλίου (OH[·]).

Το ανιόν του σουπεροξειδίου, μία πολύ καταστροφική ένωση, σχηματίζεται από τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο (O₂), ενώ η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων οδηγεί στο σχηματισμό του υπεροξειδίου (O₂²⁻). Η πρωτονίωση του ανιόντος του υπεροξειδίου δίνει μία υδρο- υπεροξυλο-ρίζα (HO₂[·]), η οποία αντιδρά

αυθόρμητα με ένα άλλο ανιόν του σουπεροξειδίου για να σχηματίσει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂).

Υπάρχουν και άλλες κατηγορίες ελευθέρων ριζών όπως οι ενεργές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), αλογονωμένες ενεργές μορφές (Reactive Halogenated Species, RHS), ενεργές μορφές θείου (Reactive Sulfur Species, RSS), και οργανικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες έχουν επίσης αρνητικές επιπτώσεις στις

Οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς άμυνας έναντι των ελευθέρων ριζών. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παράγονται ενδογενώς ή προέρχονται από εξωτερικές πηγές και περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η αναγωγάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, μέταλλα όπως το Se, το Mn, ο Cu και ο Zn, βιταμίνες όπως οι A, C και E, καθώς και άλλες ουσίες όπως η γλουταθειόνη. (Shacter, 2000)

Ως οξειδωτικό stress, ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Για το προσδιορισμό του οξειδωτικού stress χρησιμοποιούνται παράμετροι όπως η υπεροξείδωση λιπιδίων, η οξείδωση πρωτεϊνών, προϊόντα οξείδωσης DNA, η παρουσία ενεργών μορφών οξυγόνου και τυχόν αλλαγές στη κατάσταση αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως η γλουταθειόνη.

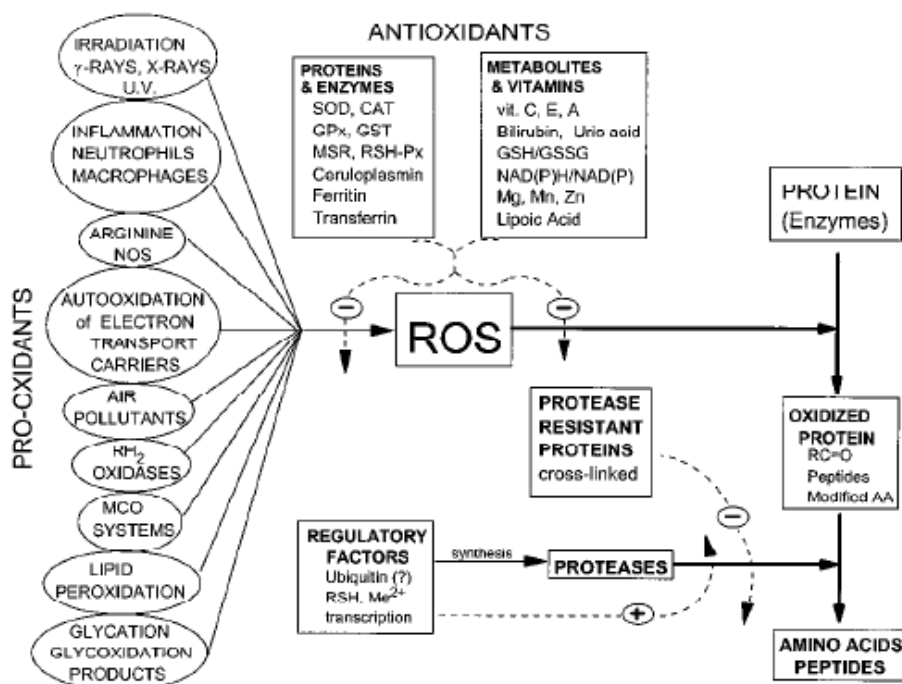
A.4 Οξείδωση πρωτεϊνών και σχηματισμός καρβονυλίων.

Η οξείδωση των πρωτεϊνών, θεωρείται αποτέλεσμα της επίδρασης οξειδωτικών παραγόντων, γήρανσης και ασθενειών. Η ύπαρξη οξειδωμένων πρωτεϊνών σε ένα οργανισμό από τα παραπάνω αίτια, μπορεί να αναλυθεί σε δύο στάδια. Αρχικά, μελετώνται οι φυσιολογικές ή μη διεργασίες που οδηγούν στο σχηματισμό ενεργών ριζών οξυγόνου ενδοκυτταρικά. Ακολούθως, ερευνάται η επίδραση των ROS, στον μετασχηματισμό βιολογικών μορίων.

Η μεγάλη αφθονία πρωτεϊνών στα κύτταρα τις καθιστά σημαντικούς στόχους. Αντιδρούν κυρίως με υδροξυλικές ρίζες και υπόκεινται σε υπεροξείδωση, καταστροφή υπολειμμάτων αμινοξέων, αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή και αποικοδόμηση. Σε βιολογικό επίπεδο, οι διαφοροποιήσεις αυτές προκαλούν απώλεια

της ενζυματικής δραστηριότητας ,αλλοιώσεις των κυτταρικών λειτουργιών όπως η παραγωγή ενέργειας, αλλαγές στη δομή και δράση κυτταρικών πρωτεϊνών.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η διαδικασία με την οποία επιδρούν οι ROS στις πρωτεΐνες .



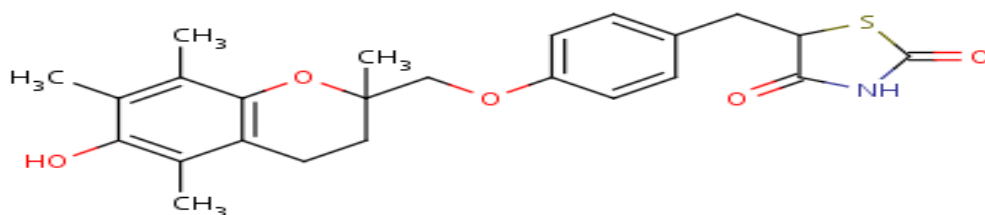
Εικόνα 3 : Σύνθεση οξειδωμένων πρωτεϊνών

Παρατηρείται ότι ο σχηματισμός οξειδωμένων μορφών πρωτεϊνών εξαρτάται από την διαθεσιμότητα τους, την ύπαρξη αντιοξειδωτικών μορίων και πρωτεολυτικές διεργασίες. Η ποσότητα οξειδωμένων πρωτεϊνών, ενδοκυτταρικά, εξαρτάται από την σχέση επίπεδο μεταξύ του ρυθμού οξείδωσης και του ρυθμού αποδόμησης των οξειδωμένων μορφών.

Παράγωγα της οξείδωσης είναι πρωτεϊνικά καρβονύλια, τα οποία παράγονται με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς. Η συγκέντρωση των ομάδων καρβονυλίων, αποτελεί πολύ καλό μέτρο για την εκτίμηση της προκαλούμενης από τις ελεύθερες ρίζες οξείδωσης των πρωτεϊνών και έχουν αναπτυχθεί πολλές και ιδιαίτερα ευαίσθητες τεχνικές για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων. (Berlett and Stadtman,1997)

A.5 Επίδραση τρογλιταζόνης στην οξείδωση κυττάρων.

Οι Θειαζολιδινεδιόνες (thiazolidinediones, TZDs) γνωστές επίσης ως γλιταζόνες, εισήχθησαν στη θεραπευτική στα τέλη του 1990 και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του Σακχαρώδη Διαβήτη. Η κατηγορία των φαρμάκων αυτών περιλαμβάνει 3 κύριους εκπροσώπους: την τρογλιταζόνη, τη ροζιγλιταζόνη και την πιογλιταζόνη. Οι ενώσεις αυτές επιδρούν στο μεταβολισμό των κυττάρων, στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας και χρησιμοποιούνται για την επιδιόρθωση βλαβών που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια. (Ghosh et al, 2007). Οι ουσίες αυτές φαίνεται να μειώνουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αυξημένη χρήση γλυκόζης και κατά συνέπεια να επηρεάζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες. Δεν είναι σαφής ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στη παραγωγή ROS, ούτε έχει εξακριβωθεί η αλληλεπίδραση τους με τα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 4: Μοριακή δομή τρογλιταζόνης

Αντικείμενο μελέτης αποτελεί η επίδραση των θειαζολιδινεδιονών στους πυρηνικούς υποδοχείς των πολλαπλασιαστών των υπεροξεισωμάτων (PPAR). Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται με

την σύνδεση κάποιου ειδικού προσδέτη (ligand) και ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Όταν συνδεθούν με τον συμπληρωματικό τους προσδέτη, υφίστανται δομικές αλλαγές που ευνοούν τον σχηματισμό δραστικών διμερών και τη μετακίνησή τους στον πυρήνα, όπου συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA και ρυθμίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Τα υπεροξεισώματα είναι κυτταρικά οργανίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη και διαθέτουν ένζυμα που εμπλέκονται σε μια σειρά από καταβολικές δραστηριότητες. Η κύρια δράση τους είναι η απενεργοποίηση των ανιόντων του υπεροξειδίου, μέσω του ενζύμου καταλάση. Εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων, τη διάσπαση των λιπαρών οξέων, την οξειδωτική διάσπαση πολυαμινών και πουρινών, του οξαλικού οξέος και τη βιοσύνθεση αιθερολιπιδίων.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (PPAR), ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη παραγωγή υπεροξεισωμάτων και ενεργοποιούν μια σειρά από μεταβολικές δραστηριότητες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και τη μεταγωγή ηλεκτρικών σημάτων. Η παραγωγή των οργανιδίων μπορεί να ενεργοποιηθεί από μια σειρά ενδογενών παραγόντων, από εξωτερικά ερεθίσματα και από τη παρουσία μορίων που μιμούνται το φυσικό μηχανισμό ενεργοποίησης της διαδικασίας. Οι γλιταζόνες είναι ουσίες που λειτουργούν ως πρόσδεμα (ligand) σε PPAR και ευνοούν τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την αύξηση των υπεροξεισωμάτων. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικές ουσίες, και γίνονται περαιτέρω έρευνες για βελτιωθεί η δράση τους.

Με βάση μελέτη που διενεργήθηκε σε *Arabidopsis thaliana* (León, 2008), ο εξωγενής μιμητικός παράγοντας κλοφιβράτη (clofibrate) ενεργοποίησε τους πυρηνικούς υποδοχείς των πολλαπλασιαστών των υπεροξεισωμάτων σε φυτά. Παρατηρήθηκε ότι ανεξάρτητα από την απουσία PPAR ομόλογης πρωτεΐνης, ενεργοποιήθηκε η βιογένεση υπεροξεισωμάτων. Αυτό σημαίνει ότι η επίδραση ανάλογων μορίων, σε φυτικούς ιστούς, ενδέχεται να προκαλεί μεταβολικές διαφοροποιήσεις.

Υλικά και Μέθοδοι

Το πείραμα είχε σαν στόχο την μελέτη του φαινομένου της γήρανσης σε βιοχημικό επίπεδο καθώς και την επίδραση της τρογλιταζόνης στις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων. Οι χρονοσειρές των κάλλων που δημιουργήθηκαν, μελετήθηκαν ως προς την περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνες, το βαθμό της οξειδωσης που έχουν υποστεί αυτές, εκφραζόμενη σε πρωτεϊνικά καρβονύλια και τις ελεύθερες ρίζες που έχουν παραχθεί.

B.1 Ιστοκαλλιέργεια *Arabidopsis thaliana*

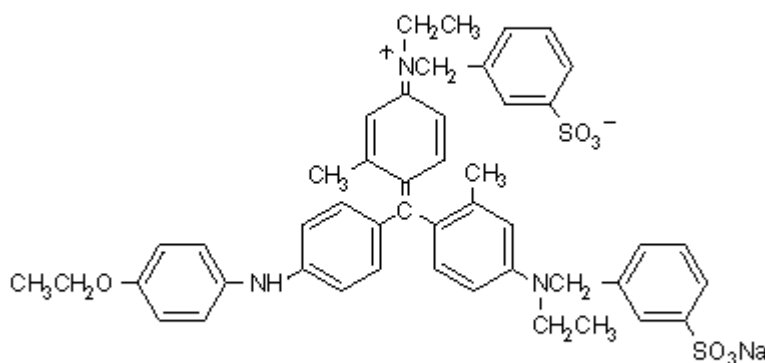
Σπόροι *Arabidopsis thaliana* χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία κάλλων σε υπόστρωμα B5 (Gamborg et al,1968), εμπλουτισμένο με 2,25μM 2,4 D και 0,25μM kinetin. Οι σπόροι αφού απολυμάνθηκαν με αιθυλική αλκοόλη και υποχλωριώδες νάτριο 10%, τοποθετήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, εντός θαλάμου Laminar Flow, σε τρυβλία με 20 ml θρεπτικό υπόστρωμα. Η καλλιέργεια των κάλλων έγινε σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 25 °C και φωτοπερίοδο 16 ωρών. Μετά από ένα μήνα καλλιέργειας οι νεαροί κάλλοι μεταφέρθηκαν σε φρέσκο υπόστρωμα με την ίδια σύσταση. Στη συνέχεια οι ιστοί κάθε είκοσι μέρες μεταφέρονταν σε νέο υπόστρωμα.

Για να μελετηθεί η επίδραση της τρογλιταζόνης οι σπόροι τοποθετήθηκαν από την αρχή σε υπόστρωμα B5, με τις ίδιες ορμόνες ανάπτυξης, εμπλουτισμένο με 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις 10 nM και 10 μM αντίστοιχα. Σε κάθε υποκαλλιέργεια που ακολουθούσε, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε φρέσκο μέσο με την ίδια σύσταση.

B.2 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

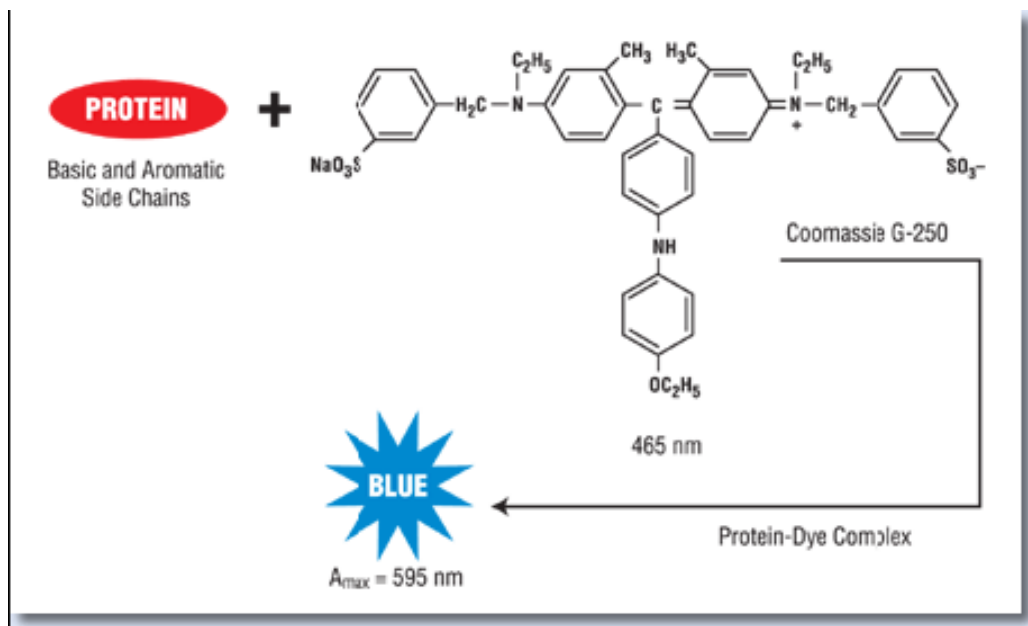
B.2.1. Αρχή της μεθόδου Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε διάφορα δείγματα (Bradford, 1976). Είναι ιδιαίτερα σύντομη και εύκολη και περιορίζει τα μειονεκτήματα άλλων φωτομετρικών μεθόδων προσδιορισμού των πρωτεϊνών. Η αρχή της βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με πρωτεΐνες δημιουργώντας ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής.



Εικόνα 5 :Χημική δομή Coomassie Brilliant Blue G-250

Η χρωστική προσδένεται με πρωτεΐνες σε κατάλοιπα αμινοξέων (αργινίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης, ιστιδίνης, φαινυλαλανίνης) και προκαλεί μια μετατόπιση της απορρόφησης της βαφής. Η ελεύθερη χρωστική που δεν έχει συνδεθεί απορροφά στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής στα 595nm. Μετά από πέντε λεπτά από την προσθήκη της χρωστικής στο δείγμα της πρωτεΐνης, έχει ολοκληρωθεί η συμπλοκοποίηση και η αλλαγή στο χρώμα διατηρείται σταθερή για περίπου μία ώρα. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερη γρήγορη και οικονομική. Θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη και μπορεί να προσδιορίσει απόλυτες ποσότητες πρωτεΐνης 1 έως 200μg..



Εικόνα 6: Σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής (πηγή:http://www.cultek.com/inf/otros/perfil-proveedores/Pierce_manual_protein_assay.pdf)

Υπάρχουν δύο διαφορετικές διαδικασίες που μπορεί να εφαρμοστούν ανάλογα με την συγκέντρωση πρωτεϊνών που ανιχνεύονται. Η Bradford assay εφαρμόζεται για ποσότητες 20-200 μικρογραμμάρια και η Bradford micro-assay έχει σχεδιαστεί για αναλύσεις με μεγαλύτερη ευαισθησία και χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 1-20 μικρογραμμάρια.

B.2.2. Διαδικασία μέτρησης πρωτεϊνών

Αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις κάποιας πρωτεΐνης π.χ. αλβουμίνη με βάση την απορρόφηση στο ορατό, στα 595 nm. Κατόπιν μετρείται η απορρόφηση στα 595 nm του άγνωστου δείγματος και μέσω της καμπύλης υπολογίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων. Το δείγμα, προκύπτει από ομογενοποίηση ιστού και εκχύλιση των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ειδικό buffer. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο και μετά από τη πάροδο πέντε λεπτών υπολογίζεται φωτομετρικά η απορρόφηση. Η άμεση σχέση της απορρόφησης στα 595nm με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης οφείλεται στον 'δεσμό' που δημιουργείται μεταξύ της πρωτεΐνης και της Coomassie Brilliant Blue G-250.

Αναλυτικότερα η διαδικασία έχει ως :

I. Δημιουργία Πρότυπης Καμπύλης Απορρόφησης

Στόχος είναι η δημιουργία καμπύλης απορρόφησης από 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις BSA (Bovine Serum Albumin) και blank.

Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα με BSA, διαλύοντας 10 mgr σε 100 ml ddH₂O. Στη συνέχεια με βάση τη χρωστική παρασκευάζεται ένα διάλυμα το οποίο αλληλεπιδρά με της πρωτεΐνες . Το Bradford reagent αποτελείται από :

- 100 mgr Coomassie Blue G-250
- 50 ml 95% EtOH
- 100 ml 85 % Phosphoric acid
- Τελικός όγκος διαλύματος 1 lt, με ddH₂O

Τοποθετούμε σε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης (microtiter) ELISA:

BSA solution (μl)	H ₂ O (μl)	Bradford reagent (μl)
0	40	160
4	36	160
8	32	160
12	28	160
16	24	160
20	20	160

Αφήνουμε για 5 min, ώστε να γίνει η αντίδραση πρωτεΐνης-χρωστικής και μετράμε (φωτόμετρο) στα 595 nm.

Η κάθε μέτρηση έχει ικανό αριθμό επαναλήψεων για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η τιμή του τυφλού αντιδραστήριου (reagent blank) πρέπει να αφαιρεθεί από τις υπόλοιπες τιμές για να εξαχθεί έτσι η καθαρή τελική τιμή. Η κλίση της πρότυπης καμπύλης, περιγράφεται από μια γραμμική εξίσωση τύπου $Y=ax + b$, θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της πρωτεΐνης στο δείγμα σε ισοδύναμα BSA.

II. Εκχύλιση πρωτεϊνών

Οι φυτικοί ιστοί που θα αναλυθούν ομογενοποιούνται σε ειδικό Buffer εκχύλισης πρωτεϊνών. Στο πείραμα, η ομογενοποίηση των κάλλων έγινε σε Ultra Turex. Το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης (Müller et al, 2001) είναι το ακόλουθο:

- 50mM Tris-HCL (PH=8)
- 10 mM EDTA
- 10 mM DDT
- 10% Glycerol

Το υλικό διατηρείται σε πάγο, μετά την ομογενοποίηση, για να αποφευχθεί οξείδωση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί μια διαδικασία ψυχόμενης φυγοκέντρισης για να απομακρυνθούν υπολείμματα φυτικού ιστού.

- Η φυγόκεντρος προψύχεται στους 4 °C , για 15 min, στις 5.000 xg.
- φυγοκεντρούμε το διάλυμα σε σωλήνες eppendorf, ζυγισμένα, και τρέχει στα 12.000 xg.για 20 min, στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των πρωτεϊνών ή ψύχεται για μελλοντική χρήση.

Γενικά όλα τα αντικείμενα πρέπει να είναι αποστειρωμένα και οι χειρισμοί να γίνονται σε πάγο.

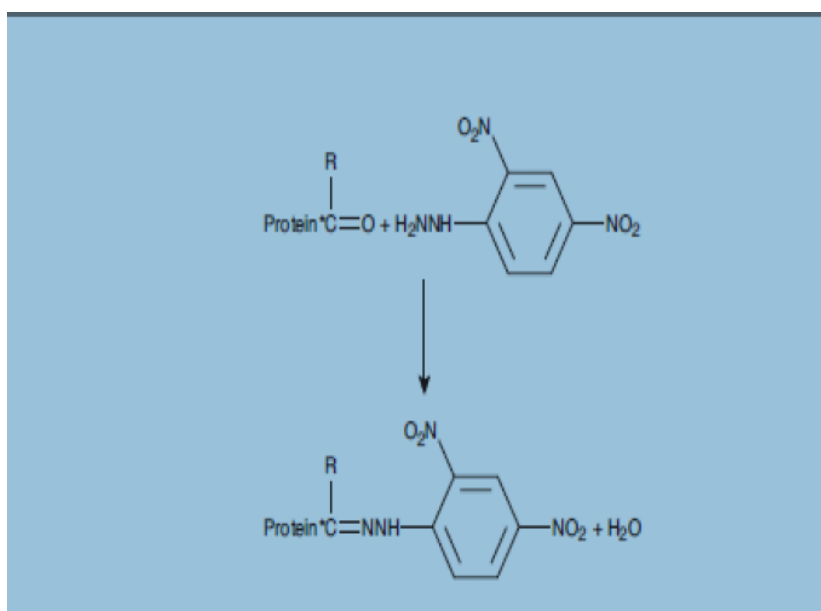
III. Μέτρηση διαλυτών πρωτεϊνών σε άγνωστο δείγμα

Η διαδικασία είναι φωτομετρική, χρησιμοποιούνται το διάλυμα της χρωστικής (Bradford reagent) και ddH₂O. Σε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης (microtiter plate), τοποθετούμε 20μl ddH₂O, 20μl από το δείγμα και 160 μl αντιδραστήριο Bradford. Ως τυφλό (blanc), ώστε να αφαιρέσουμε την επίδραση του μέσου στην απορρόφηση, χρησιμοποιούμε 20μl ddH₂O, 20μl από το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και 160μl αντιδραστήριο Bradford.

Η μέτρηση γίνεται στα 595 nm, μετά τη πάροδο 5 λεπτών για να ολοκληρωθεί η αντίδραση πρωτεΐνης-χρωστικής. Από τα αποτελέσματα αφαιρείται το τυφλό και με βάση τη πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η συγκέντρωση διαλυτών πρωτεϊνών.

B.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων μετατρέπονται σε καρβονύλια. Ο προσδιορισμός των καρβονυλομάδων των πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω του αντιδραστηρίου DNPH. Κατά την αντίδραση σχηματίζει την 2,4- δινιτρο-φαινυλ-υδραζόνη (DNP).



Εικόνα 7: Σύνδεση πρωτεΐνης DNPH

Το σύμπλοκο μπορεί να αναλυθεί με φασματοφωτομετρία, μελετώντας την απορρόφηση μεταξύ 360-390nm.

Η διαδικασία (Levine et al,1990) ολοκληρώνεται σε τρία στάδια:

I. Απομάκρυνση νουκλεϊκών οξέων από το δείγμα

Τα νουκλειικά οξέα περιέχουν καρβονύλια και θα αντιδράσουν με την DNPH. Σε περίπτωση που δεν απομακρυνθούν από το δείγμα, θα υπάρχει λανθασμένη εκτίμηση της οξειδωσης των πρωτεϊνών, θεωρώντας τη μεγαλύτερη από τη πραγματική τιμή. Για να αποφευχθεί τυχόν υπερεκτίμηση του καρβονυλικού περιεχομένου, το δείγμα υπόκειται σε μεταχείριση προκειμένου να απομακρυνθούν τα νουκλειικά οξέα. Η κατακρήμνιση τους μετά από χειρισμό με 1% θειϊκή στρεπτομυκίνη δίνει πολύ καλά αποτελέσματα.

Η διαδικασία που ακολουθείται στο δείγμα που προέρχεται από τη προηγούμενη μέθοδο εκχύλισης πρωτεϊνών είναι η ακόλουθη:

- Παρασκευάζεται διάλυμα θειϊκής στρεπτομυκίνης 10% (w/v), σε υδατικό διάλυμα HEPES με PH=7,2. Αναμιγνύεται ποσότητα από το διάλυμα και το δείγμα σε αναλογία 1:9.
- Αναμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000xg για 10 min και απομάκρυνση του ιζήματος.

II .Αντίδραση με DNPH

Το υπερκείμενο, μετά την απομάκρυνση των νουκλειικών οξέων χρησιμοποιείται για την αντίδραση με την DNPH.

- Κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες που περιέχονται στο υπερκείμενο, μετά από μεταχείριση με ίσο όγκο υδατικού διαλύματος TCA 20% (β/ο). Διατηρούμε στον πάγο για 15 min και μετά ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11000xg για 10 min.
- Διατηρούμε το ίζημα σε δύο μέρη, Στο ένα μέρος προστίθενται 0,5 ml διαλύματος DNPH (10 mM DNPH σε 2M HCL) και στο άλλο 0,5 ml HCL 2M.
- Διατηρούμε στο σκοτάδι σε Θ δωματίου και κάθε 15 min υπόκειται σε ανάμειξη με vortexing
- Προστίθεται 0,5 ml παγωμένου TCA 20% (β/ο) και φυγοκέντρηση 11000xg για 3 min.

- Το ίζημα διατηρείται και ξεπλένεται 3 φορές με 1 ml διαλύματος αιθανόλης:οξικού αιθυλεστέρα (1:1), για να απομακρυνθεί η χρωστική. Προστίθεται το διάλυμα, αναμονή για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 11000xg για 3 min.
- Στο τελικό ίζημα προστίθεται ποσότητα 0,6 ml, από διάλυμα γουανιδίνης 6M, με 20 mM K₂PO₄ και pH=2,3 το οποίο ρυθμίζεται με τριφθοροοξικό οξύ.
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 37°C για χρονικό διάστημα 15 λεπτών.
- Τελευταία φυγοκέντρηση στα 11000xg για 3 min, όπου απορρίπτεται το ίζημα των αδιάλυτων συστατικών και διατηρείται το υπερκείμενο.

III .Φασματοφωτομετρία καρβονυλίων

Η διαδικασία της φασματοφωτομετρίας είναι η εξής:

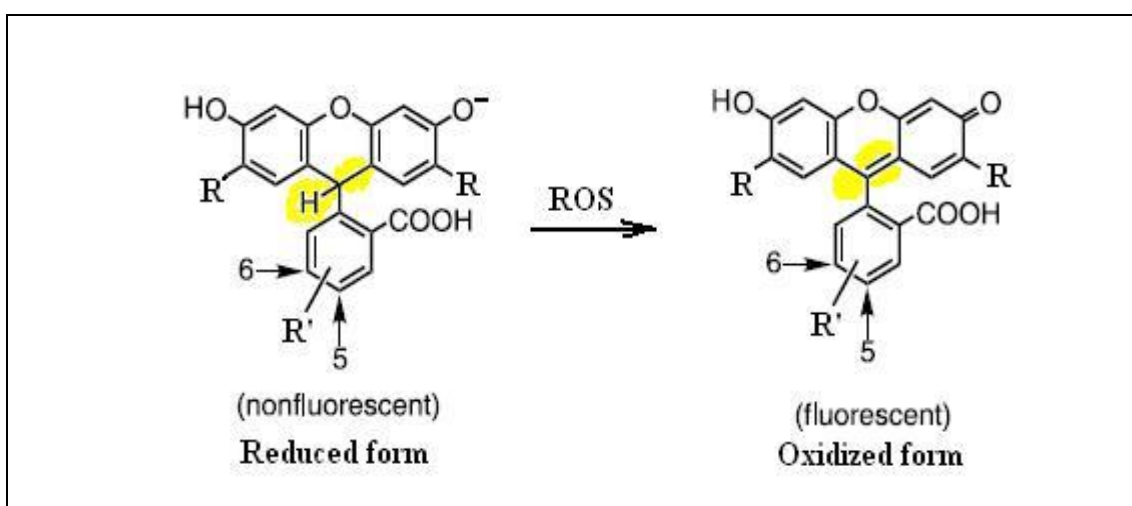
- Μεταφορά 220μL υπερκειμένου σε μικροπλάκα τύπου ELISA (96-well plate).
- Χρησιμοποιείται ως τυφλό το διάλυμα υπερκειμένου-0,5 ml HCL 2M.
- Υπολογίζεται το περιεχόμενο σε καρβονύλια C (nmol/ml) από την απορρόφηση που παρατηρείται σε εκπομπή 360nm-390nm, με βάση την εξίσωση: Απορρόφηση (360 - 390 nm)= C x E, όπου E ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (E=22,000 M⁻¹cm⁻¹).

B.4 Προσδιορισμός ελεύθερων ριζών (ROS).

Ο προσδιορισμός των ελεύθερων ριζών γίνεται με φθορισμομετρία. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην φθορίζουσα χρωστική, 2,7-διοξεική διχλωροφλουορεσίνη (2,7-dichlorofluorescein diacetate -H2DCFDA). Οι κάλλοι (Gallego et al. 1994) βάρους 250 mg, επωάζονται για μία ώρα στο σκοτάδι σε 1.0 ml buffer το οποίο αποτελείται από:

- 50.0 mM Tris-HCl (pH 7.8)
- 5.0 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης
- 1.0 mM EDTA
- 2 μ M Χρωστικής H2DCFDA

Στη συνέχεια ο ιστός ξεπλένεται δύο φορές με το ίδιο διάλυμα, χωρίς την παρουσία χρωστικής και ακολουθεί ομογενοποίηση. Το ίζημα υπόκειται σε φυγοκέντρηση σε 10000g για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που παραμένει, αναλύεται με φθορισμομετρία, με διέγερση στα 485 και εκπομπή στα 530 nm.



Εικόνα 8: Οξειδωμένη μορφή χρωστικής H2DCFDA

Γ. Αποτελέσματα

Γ.1 Ολικές Πρωτεΐνες

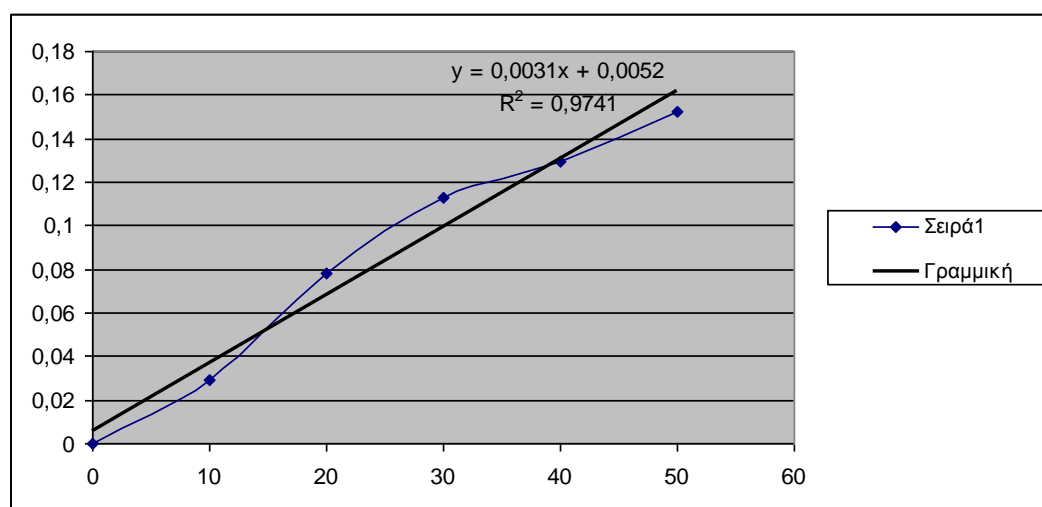
Για να μελετηθεί η επίδραση του παράγοντα χρόνου στις βιοχημικές διεργασίες των κυττάρων, εξετάζεται η ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών. Με βάση μια πρότυπη καμπύλη που κατασκευάζεται από βόεια αλβουμίνη (BSA) και φωτομετρικές αναλύσεις, εκτιμάται η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκάστοτε δείγμα. Ακολουθεί η στατιστική επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Γ.1.1 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης

Στο πείραμα πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μετρήσεις πρωτεϊνικού περιεχομένου, στα 595 nm. Σε κάθε μέτρηση παρασκευαζόταν και χρησιμοποιούταν νέο διάλυμα της χρωστικής. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, να σχεδιάζεται νέα πρότυπη καμπύλη αναφοράς, ώστε να εξασφαλίζετε ότι τα αποτελέσματα των μετρήσεων, γνωστών και άγνωστων δειγμάτων, προκύπτουν από τη χρήση ίδιων αντιδραστηρίων. Έτσι έχουν προκύψει οι εξής πρότυπες καμπύλες:

I. Πρότυπη Καμπύλη Α.

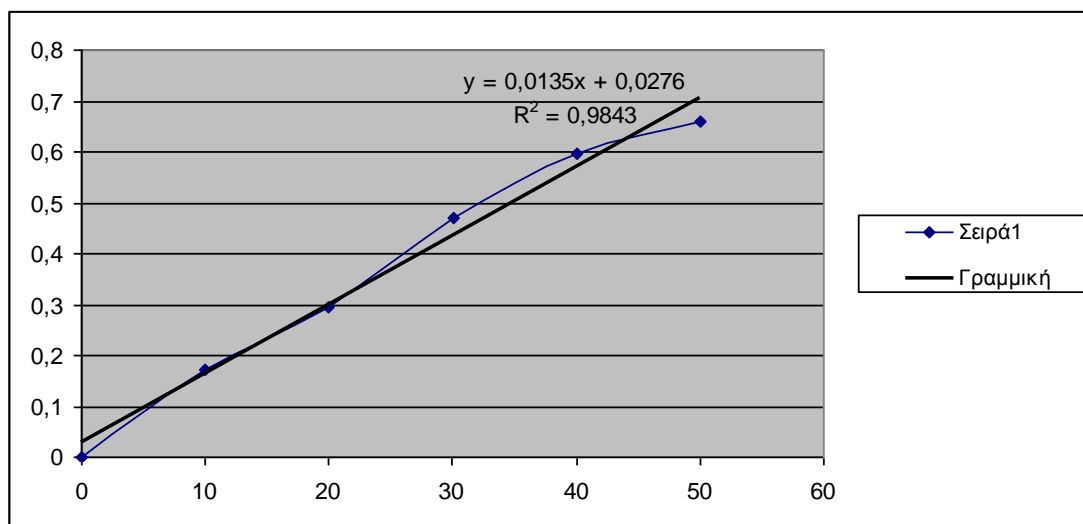
Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει η καμπύλη Α που περιγράφεται από την εξίσωση : $y = 0,0031x + 0,0052$ με $R^2 = 0,9741$



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Α

II. Πρότυπη Καμπύλη Β.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει η καμπύλη Β που περιγράφεται από την εξίσωση : $y = 0,0135x + 0,00276$ με $R^2 = 0,9843$

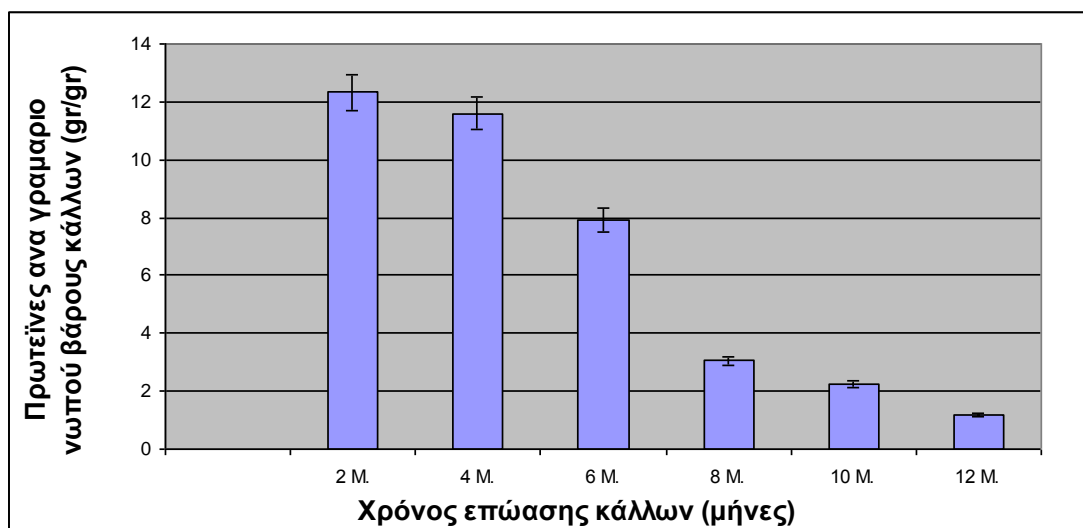


Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη Β

Γ.1.2 Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες

Οι αναλύσεις έγιναν σε κάλλους ηλικίας 2 μηνών (2M), 4 μηνών (4M), 6 μηνών (6M), 8 μηνών (8M), 10 μηνών (10M) και 12 μηνών (12M). Για την μέτρηση 8M χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη Β, ενώ για τις υπόλοιπες η Καμπύλη Α. Από την φωτομετρική ανάλυση και την αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά γραμμάριο φυτικού ιστού (κάλου) προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα :

ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΛΟΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (μgr/gr)
2 Month	12,31746032
4 Month	11,60206718
6 Month	7,927350427
8 Month	3,050367855
10 Month	2,234636872
12 Month	1,183053557



Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση Πρωτεϊνών ($\mu\text{gr/gr}$) σε κάλλους *A. thaliana* με διαφορετική διάρκεια επώασης στο θρεπτικό υπόστρωμα

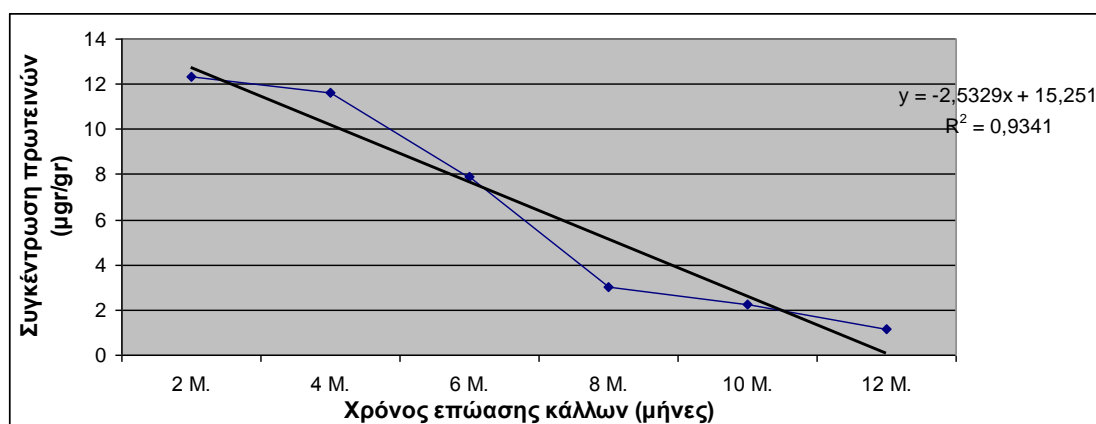
I. Σύγκριση όλων των παρατηρήσεων

Αρχικά γίνεται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για να διαπιστωθεί αν διαφέρουν σημαντικά ή αν προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό. Ελέγχοντας την κατανομή των αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι η χρονολογική σειρά εμφανίζει αρνητική κύρτωση ($KURT = -2,44966$), ενώ από την τιμή της ασυμμετρίας παρατηρούμε ότι η κατανομή είναι ασυμμετρική ($SKEW = 0,26679501$). Κατά συνέπεια οι παρατηρήσεις δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και για οποιοδήποτε έλεγχο πρέπει να εφαρμοσθούν μη παραμετρικοί έλεγχοι. Επιπλέον ο μικρός αριθμός παρατηρήσεων αποτρέπει τη χρήση παραμετρικών ελέγχων των διαφορών των μέσων.

Ο στατιστικός έλεγχος γίνεται με το μη παραμετρικό test Kruskal-Wallis (SPSS.12). Είναι μια Μη Παραμετρική διαδικασία, που μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύγκριση τριών ή περισσότερων πληθυσμών. Για το έλεγχο χρησιμοποιείται η διάμεσος των παρατηρήσεων και όχι ο αριθμητικός μέσος και αν η μηδενική υπόθεση απορριφτεί τότε τουλάχιστον δύο πληθυσμοί διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς τη διάμεση τιμή τους.

Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι οι διάμεσοι διαφέρουν αφού $p\text{-value} < 0.05$, άρα απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση ότι τα δεδομένα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό.

Η περιεκτικότητα των ιστών σε πρωτεΐνη διαφέρει σε συνάρτηση του χρόνου. Τα αποτελέσματα περιγράφονται με τη χρήση γραμμής τάσης.



Διάγραμμα 4: Γραμμή Τάσης ποσότητας πρωτεϊνών σε σχέση με τη διάρκεια επώασης των κάλλων.

Παρατηρείται μία μείωση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη πάροδο του χρόνου, υπό μορφή σιγμοειδούς καμπύλης. Η εξέλιξη αυτή μπορεί να περιγραφεί με την γραμμική εξίσωση:

$$y = -2,5329x + 15,251$$

$$\text{με } R^2 = 0,9341$$

II. Επιμέρους συγκρίσεις των παρατηρήσεων.

Από τις τιμές των διαμέσων, προκύπτει η ανάγκη για περαιτέρω έλεγχο των παρατηρήσεων, προκειμένου να διαπιστωθεί το αν διαφέρουν σημαντικά τα γειτονικά ζεύγη. Δηλαδή να συγκριθούν οι παρατηρήσεις ανά δύο, π.χ. 2M με 4M, 4M με 6M κλπ. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με το μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U, που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των διαμέσων δύο ανεξάρτητων δειγμάτων.

Στο πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται το p-value του κάθε ελέγχου. Εάν η τιμή που λαμβάνει σε κάθε περίπτωση χωριστά είναι <0.05 , τότε οι παρατηρήσεις διαφέρουν στατιστικά.

Παρατηρήσεις	Έλεγχος Mann-Whitney, p-value
2M /4M	p-value=0.465>0.05 .
4M/6M	p-value=0.009<0.05
6M/8M	p-value=0.010<0.05
8M/10M	p-value=0.582>0.05
10M/12M	p-value=0.116>0.05

Από το στατιστικό έλεγχο, παρατηρείται ότι για τους πρώτους 4 μήνες δεν παρουσιάζεται σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, στη συνέχεια κατά τον έκτο μήνα και όγδοο μήνα η συγκέντρωση μειώνεται και η φθίνουσα πορεία που ακολουθείται στη συνέχεια δεν είναι σημαντική.

Γ.1.3 Επίδραση της τρογλιταζόνης στην ποσότητα πρωτεϊνών

Για να μελετηθεί η δράση του αντιοξειδωτικού παράγοντα τρογλιταζόνη σε φυτικά κύτταρα, καλλιεργήθηκαν κάλοι σε υπόστρωμα που είχε εμπλουτιστεί με την ουσία σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Για τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου κάλων 4M που αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση τρογλιταζόνης 10nM (4M.Tr.Nano) και 10μM (4M.Tr.Micro), χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη Β. Για τις περιπτώσεις κάλων 2M με τρογλιταζόνη η Καμπύλη Α. Από την φωτομετρική ανάλυση και την αναγωγή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά γραμμάριο φυτικού ιστού (κάλου) προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα :

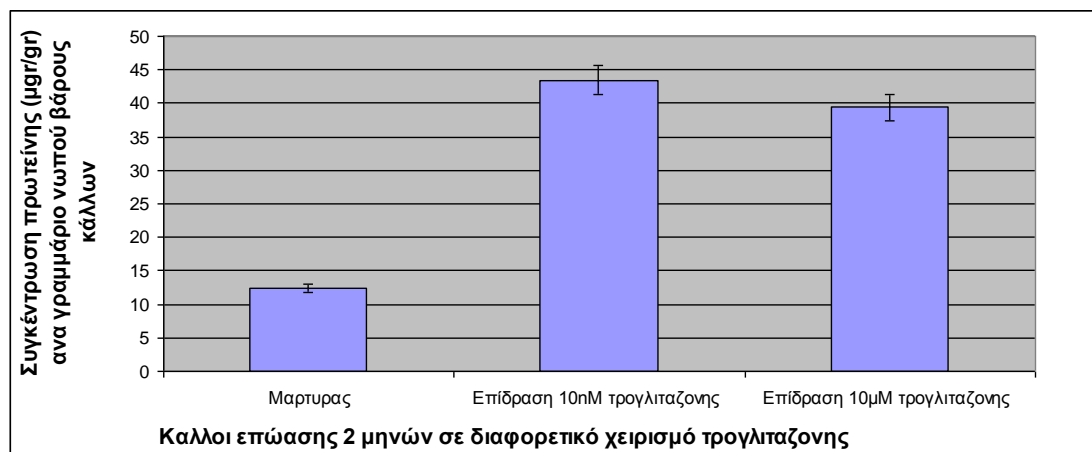
ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΛΟΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (μgr/gr)
2M	12,31746032
2 M.Tr.Nano.	43,43434343
2M.Tr.Micro.	39,4100295

4M	11,60206718
4M.Tr.Nano.	31,24731183
4M.Tr.Micro.	14,76050831

Το πείραμα σχεδιάστηκε ώστε να υπάρχουν ως μάρτυρες, κάλοι ηλικίας δύο και τεσσάρων μηνών σε υπόστρωμα B5 και κάλλοι με αντίστοιχο χρόνο ανάπτυξης που έχουν δεχθεί την επίδραση 10nM και 10μM τρογλιταζόνης. Τα δεδομένα του πειράματος αναλύονται στατιστικά ώστε να διερευνηθεί εάν η τρογλιταζόνη επιδρά στην συσσώρευση πρωτεϊνών, το πόσο επηρεάζει η συγκέντρωση της και αν κάλοι διαφορετικής ηλικίας αντιδρούν διαφορετικά στη παρουσία της.

I. Επίδραση της τρογλιταζόνης στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάλων

Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι μέσοι των παρατηρήσεων για κάλλους ηλικίας 2M με ή χωρίς την επίδραση τρογλιταζόνης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάλλους δυο μηνών *A. thaliana* οι οποίοι εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τρογλιταζόνης.

Για να διαπιστωθεί το αν η διαφορά τους είναι σημαντική υπόκεινται σε έλεγχο με το μη παραμετρικό test Kruskal-Wallis. Οι διάμεσοι διαφέρουν στατιστικά

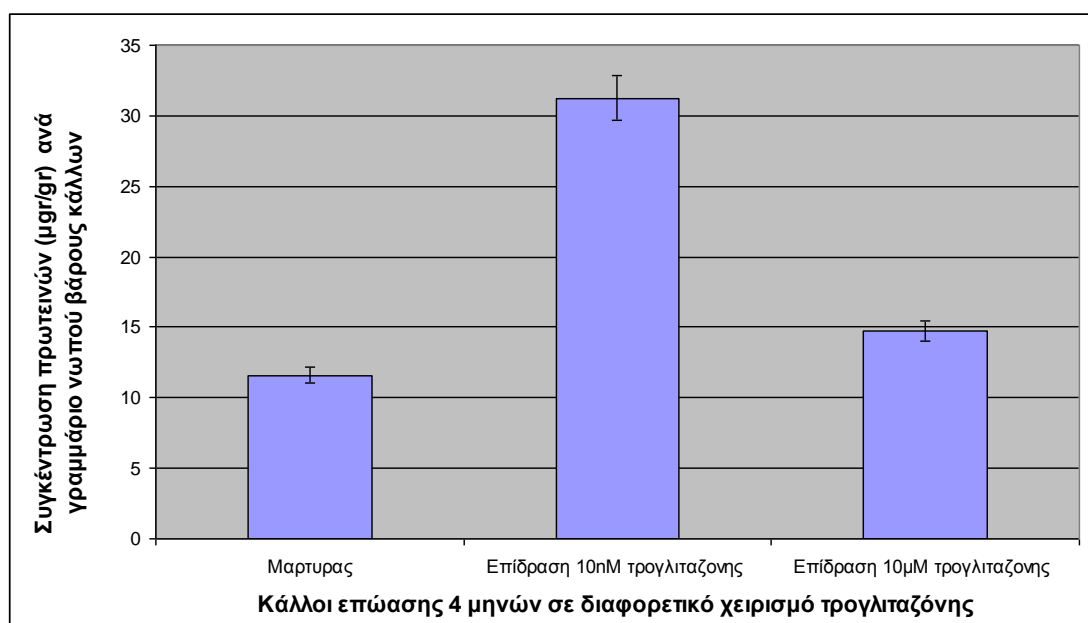
αφού η $p\text{-value}=0.005<0.05$, άρα απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση ότι τα δεδομένα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό και τουλάχιστον δύο παρατηρήσεις διαφέρουν σημαντικά.

Στη συνέχεια ελέγχονται οι παρατηρήσεις ανά ζεύγη προκειμένου να διαπιστωθεί ποιοι πληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορές. Η τιμή του κάθε ελέγχου παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Παρατηρήσεις	Έλεγχος Mann-Whitney, p-value
2M /2 M.Tr.Nano.	$p\text{-value}=0.009<0.05$.
2M/2M.Tr.Micro.	$p\text{-value}=0.009<0.05$
2 M.Tr.Nano/2M.Tr.Micro.	$p\text{-value}=0.117<0.05$

Με βάση το στατιστικό έλεγχο η επίδραση της τρογλιταζόνης στην συσσώρευση πρωτεϊνών είναι σημαντική, ενώ δεν παρουσιάζονται διαφορές στην επίδραση των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων της ουσίας.

Στο ακόλουθο ραβδόγραμμα παρουσιάζονται οι μέσοι των παρατηρήσεων για κάλους 4Μ και την επίδραση της τρογλιταζόνης, σε δύο συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάλους τεσσάρων μηνών *A. thaliana* οι οποίοι εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τρογλιταζόνης

Σύμφωνα με τη στατιστική δοκιμασία, οι διάμεσοι των παρατηρήσεων διαφέρουν αφού η $p\text{-value}=0.003<0.05$, άρα απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση ότι τα δεδομένα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό.

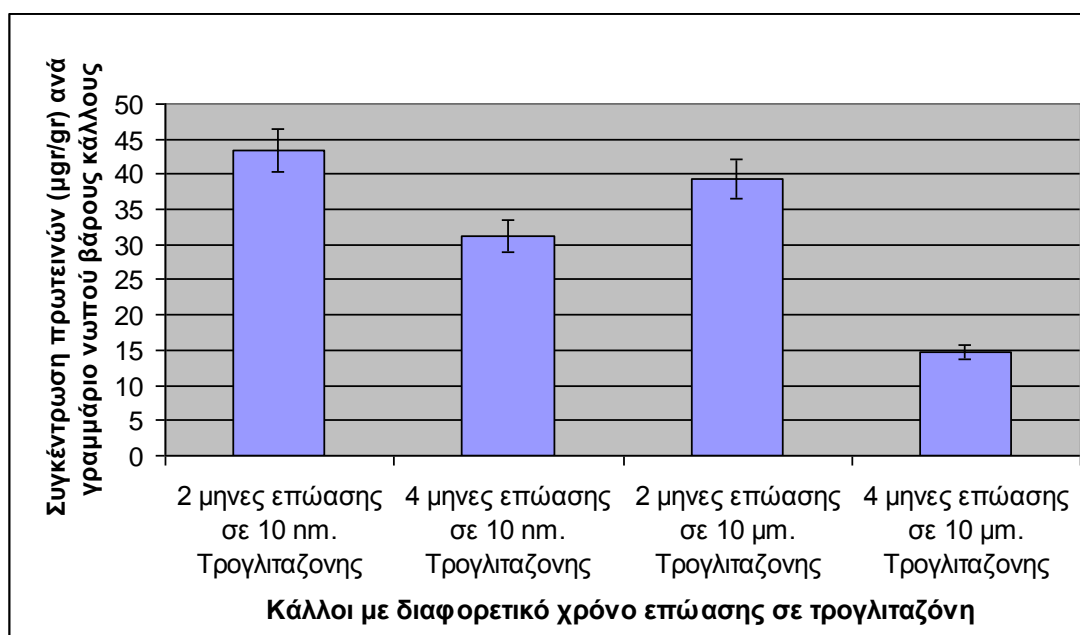
Στη συνέχεια ελέγχονται οι παρατηρήσεις ανά ζεύγη προκειμένου να διαπιστωθεί ποιοι πληθυσμοί παρουσιάζουν διαφορές. Η τιμή του κάθε ελέγχου παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Παρατηρήσεις	Έλεγχος Mann-Whitney, p-value
4M /4 M.Tr.Nano.	$p\text{-value}=0.006<0.05$.
4M/4M.Tr.Micro.	$p\text{-value}=0.143<0.05$
4 M.Tr.Nano/4M.Tr.Micro.	$p\text{-value}=0.004<0.05$

Η επίδραση της τρογλιταζόνης σε συγκέντρωση 10 nM, είναι στατιστικά σημαντική, σε σχέση και με τις άλλες δύο παρατηρήσεις.

II. Επίδραση ίδιας συγκέντρωσης τρογλιταζόνης σε κάλους διαφορετικής ηλικίας

Γίνεται στατιστικός έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης (10 nM και 10 μM) σε κάλους ηλικίας διαφορετικής ηλικίας, 2 και 4 μηνών.



Διάγραμμα 7: Συγκέντρωση πρωτεϊνών (μgr/gr) σε κάλλους διαφορετικού χρόνου επώασης, υπό την επίδραση δύο χειρισμών με τρογλιταζόνη.

Ο στατιστικός έλεγχος των διαφορών που παρουσιάζεται στη κάθε περίπτωση αναλύεται ως:

- Συγκέντρωση 10 nM

Ο στατιστικός έλεγχος δείχνει ότι υπάρχει σημαντική διαφορά, μεταξύ των παρατηρήσεων, αφού η $p\text{-value}=0.006<0.05$

- Συγκέντρωση 10 μM

Ο στατιστικός έλεγχος δείχνει ότι υπάρχει σημαντική διαφορά, μεταξύ των παρατηρήσεων, αφού η $p\text{-value}=0.006<0.05$

Επομένως και στις δύο περιπτώσεις, η παρουσία τρογλιταζόνης στο θρεπτικό μέσο προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε σχέση με τον μάρτυρα. Η επίδραση της τρογλιταζόνης είναι διαφορετική μέσα στο χρόνο και επιδρά πολύ περισσότερο σε κάλλους δύο μηνών σε σχέση με κάλλους τεσσάρων μηνών.

Γ.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Οι αναλύσεις έγιναν σε κάλλους ηλικίας 2 μηνών (2M) ,4 μηνών (4M), 6 μηνών (6M), 8 μηνών (8M), 10 μηνών (10M) και 12 μηνών (12M). Από την φωτομετρική ανάλυση και την αναγωγή της συγκέντρωσης των καρβονυλίων ανά μgr πρωτεϊνών προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα :

ΚΑΛΟΣ	ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ (nmol/ μgr)
2M	0,030752
4M	0,045708
6M	0,057339
8M	0,248356
10M	0,305114
12M	0,896499

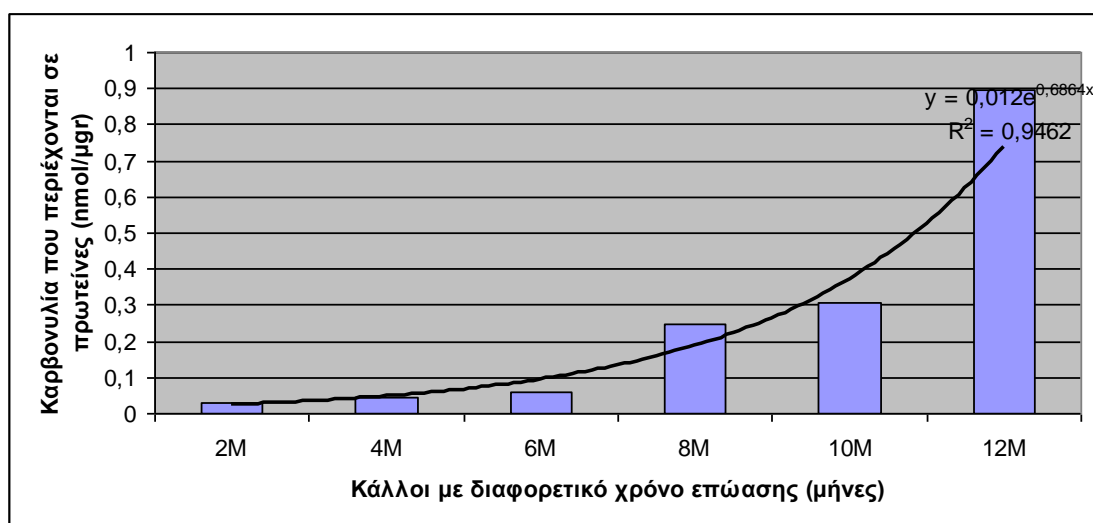
I. Σύγκριση όλων των παρατηρήσεων

Γίνεται στατιστική επεξεργασία για να μελετηθεί αν η πορεία της καρβονυλίωσης πρωτεϊνών, επηρεάζεται από την ηλικία του ιστού. Χρησιμοποιείται ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis για να διαπιστωθεί αν τα αποτελέσματα διαφέρουν. Ο στατιστικός έλεγχος δείχνει ότι υπάρχει σημαντική διαφορά, μεταξύ των παρατηρήσεων, αφού η $p\text{-value}=0.017<0.05$

Η περιεκτικότητα των ιστών σε πρωτεϊνικά καρβονύλια διαφέρει με τη πάροδο του χρόνου. Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί παρατηρείται μια αυξητική τάση στην παρουσία πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Το φαινόμενο περιγράφεται με τη χρήση γραμμής τάσης, όπου διαπιστώνεται μια εκθετική πορεία συσσώρευσης καρβονυλίων. Η εξίσωση που περιγράφει τη πορεία αυτή είναι η εξής:

$$y = 0,012e^{0,6864x}$$

$$R^2 = 0,9462$$



Διάγραμμα 8 : Γραμμή Τάσης συσσώρευσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κάλλους με διαφορετικό χρόνο επώασης στο θρεπτικό μέσο.

II. Επιμέρους συγκρίσεις των παρατηρήσεων.

Στη συνέχεια οι παρατηρήσεις υπόκεινται σε περαιτέρω έλεγχο για να διαπιστωθεί το αν διαφέρουν σημαντικά τα γειτονικά ζεύγη. Δηλαδή, να συγκριθούν οι παρατηρήσεις ανά δύο, π.χ. 2M με 4M, 4M με 6M κλπ. Η επεξεργασία των

αποτελεσμάτων γίνεται με το μη παραμετρικό έλεγχο Mann-Whitney, που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των διαμέσων δύο ανεξάρτητων δειγμάτων.

Στο πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται το p-value του κάθε ελέγχου. Εάν η τιμή που λαμβάνει σε κάθε περίπτωση χωριστά είναι <0.05 , τότε οι παρατηρήσεις διαφέρουν στατιστικά.

Παρατηρήσεις	Έλεγχος Mann-Whitney, p-value
2M /4M	p-value=0.822 >0.05 .
4M/6M	p-value=0.507 >0.05
6M/8M	p-value=0.046 <0.05
8M/10M	p-value=0.822 >0.05
10M/12M	p-value=0.268 >0.05

Παρατηρείται ότι παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στην παρουσία πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο διάστημα μεταξύ έξι μηνών και οκτώ μηνών καλλιέργειας. Στη συνέχεια η εξέλιξη της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών δεν παρουσιάζει στατιστικά μεγάλες διαφορές.

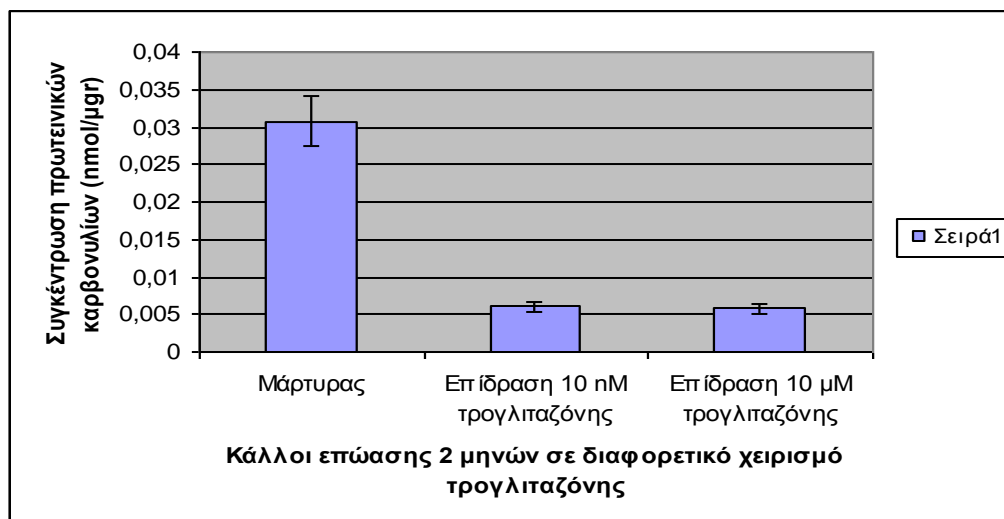
Γ.2.1 Επίδραση της τρογλιταζόνης στην ποσότητα πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Η τρογλιταζόνη, όπως έχει προαναφερθεί στην εισαγωγή, είναι ένας παράγοντας με αντιοξειδωτική δράση. Στόχος του πειράματος είναι να διαπιστωθεί τυχόν επίδραση της στην καρβονυλίωση των πρωτεϊνών, πως επηρεάζει βιοχημικές αντιδράσεις σε βάθος χρόνου και αν διαφορετικές συγκεντρώσεις τρογλιταζόνης επιδρούν με διαφορετικό τρόπο. Το πείραμα σχεδιάστηκε ώστε να υπάρχουν ως μάρτυρες, κάλοι ηλικίας δύο και τεσσάρων μηνών σε υπόστρωμα B5 και κάλοι με αντίστοιχο χρόνο ανάπτυξης που έχουν δεχθεί την επίδραση 10nM και 10μM τρογλιταζόνης. Στο πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μέσος των παρατηρήσεων όπως προκύπτει από τη σχέση πρωτεϊνικά καρβονύλια ανά πρωτεϊνικό περιεχόμενο για κάθε κάλλο.

ΚΑΛΟΣ	ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ/ ΠΡΩΤΕΙΝΗ (nmol/μgr)
2M	12,31746032
2 M.Tr.Nano.	43,43434343
2M.Tr.Micro.	39,4100295
4M	11,60206718
4M.Tr.Nano.	31,24731183
4M.Tr.Micro.	14,76050831

I. Επίδραση της τρογλιταζόνης στην επαγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κάλους 2 μηνών

Τα καρβονύλια κάλων ηλικίας 2 μηνών, που έχουν δεχθεί την επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης και ο μάρτυρας παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 9 : Επίδραση τρογλιταζόνης στη συσσώρευση πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κάλους 2 μηνών επώασης

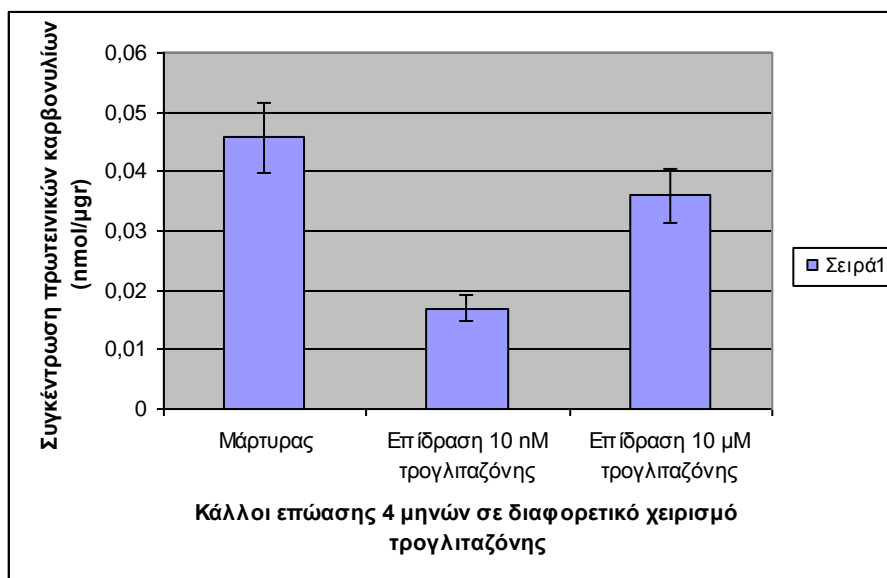
Για να διαπιστωθεί το αν οι διαφορές τους είναι σημαντικές συγκρίνονται οι παρατηρήσεις του μάρτυρα με τις 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις τρογλιταζόνης.

- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10nM (2MTrNano) είναι $p\text{-value}=0.046<0.05$, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.
- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10μM (2MTrMicro) είναι $p\text{-value}=0.046<0.05$, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.

Συνεπώς και στις δύο περιπτώσεις η παρουσία τρογλιταζόνης επιδρά στη μείωση των καρβονυλομάδων. Με βάση αυτό και για να διαπιστωθεί εάν κάποια από τις δύο συγκεντρώσεις έχει μεγαλύτερη δράση, έγινε στατιστική σύγκριση των παρατηρήσεων που προκύπτουν από την εφαρμογή διαφορετικής ποσότητας τρογλιταζόνης. Ισχύει ότι $p\text{-value}=0.827>0.05$, άρα δεν υπάρχει διαφορά στη δράση μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων.

II. Επίδραση της τρογλιταζόνης στην επαγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κάλους 4μηνών

Τα καρβονύλια κάλων ηλικίας 4 μηνών, που έχουν δεχθεί την επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης και ο μάρτυρας παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 10 : Επίδραση τρογλιταζόνης στη συσσώρευση πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κάλους 2 μηνών επώασης

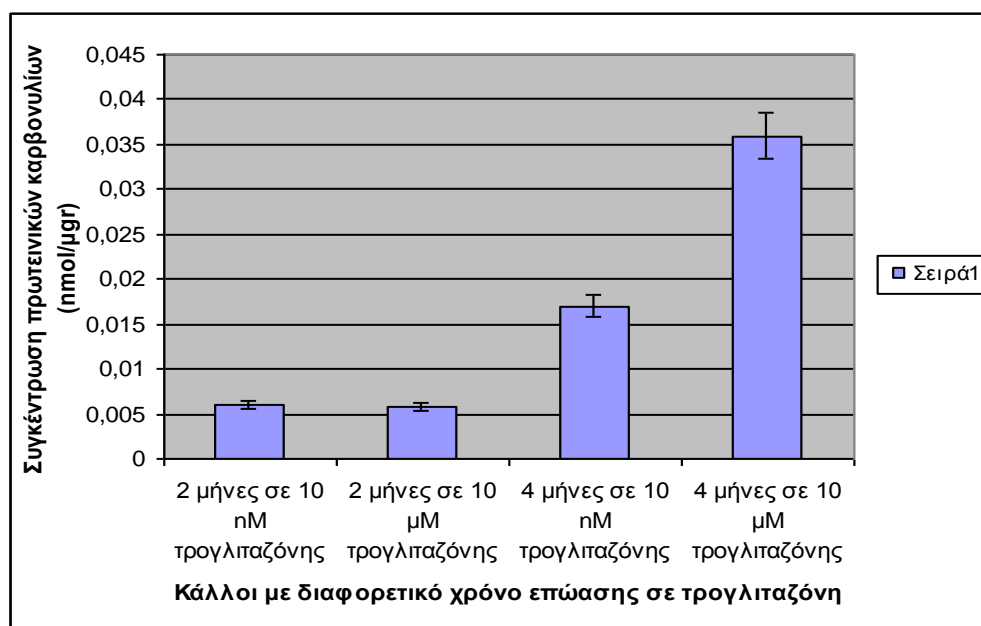
Γίνεται σύγκριση των παρατηρήσεων του μάρτυρα, διαδοχικά, με τις παρατηρήσεις των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης. Τα αποτελέσματα του ελέγχου είναι:

- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10nM είναι $p\text{-value}=0.268>0.05$, άρα δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.
- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10μM είναι $p\text{-value}=0.268>0.05$, άρα δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.

Με βάση τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι οι διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι σημαντικές κάτι που ισχύει και για τον έλεγχο που υποβλήθηκαν οι παρατηρήσεις που προκύπτουν από την εφαρμογή διαφορετικής ποσότητας τρογλιταζόνης ($p\text{-value}=0.127>0.05$)

III. Επίδραση ίδιας συγκέντρωσης τρογλιταζόνης σε κάλους διαφορετικής ηλικίας

Για να εξακριβωθεί η δράση της τρογλιταζόνης σε σχέση με την ηλικία του κάλλου, μελετάται η επίδραση ίδιας συγκέντρωσης της ουσίας, σε κάλους διαφορετικής ηλικίας. Στο πείραμα, υπάρχουν δύο συγκεντρώσεις (10nM και 10μM) που εφαρμόζονται σε κάλους διαφορετικής ηλικίας, δύο μηνών και τεσσάρων μηνών.



Διάγραμμα 11 : Επίδραση τρογλιταζόνης Στη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανάλογα με την ηλικία των κάλλων

Επομένως, πραγματοποιούνται δύο έλεγχοι, με βάση την συγκέντρωση της ουσίας στο μέσο ανάπτυξης.

- Επίδραση συγκέντρωσης 10nM:

Η στατιστική δοκιμασία δείχνει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά, μεταξύ των παρατηρήσεων, αφού η $p\text{-value}=0.127 < 0.05$

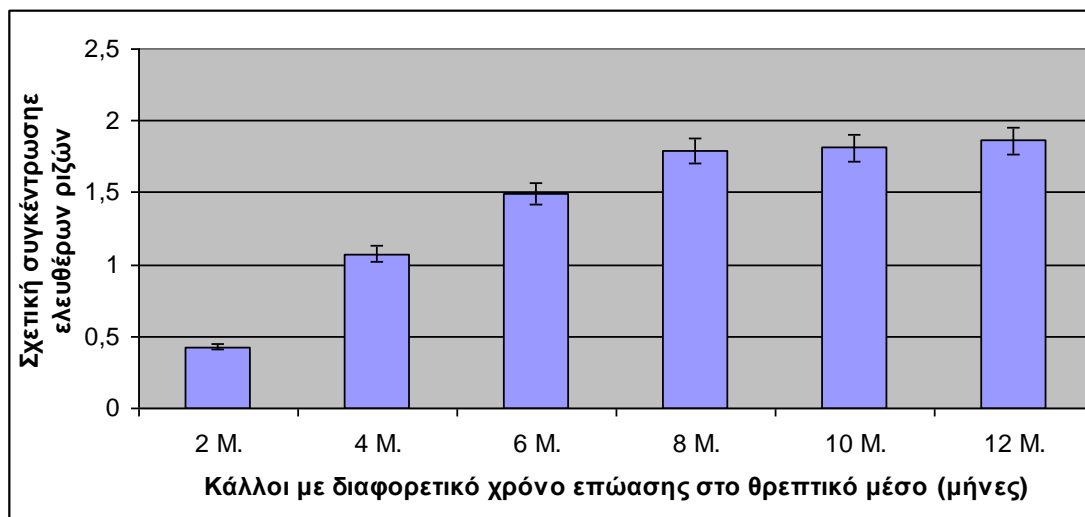
- Επίδραση συγκέντρωσης 10μM:

Από το στατιστικό έλεγχο προκύπτει ότι η $p\text{-value}=0.048 < 0.05$, άρα οι παρατηρήσεις διαφέρουν.

Γ.3 Ελεύθερες Ρίζες

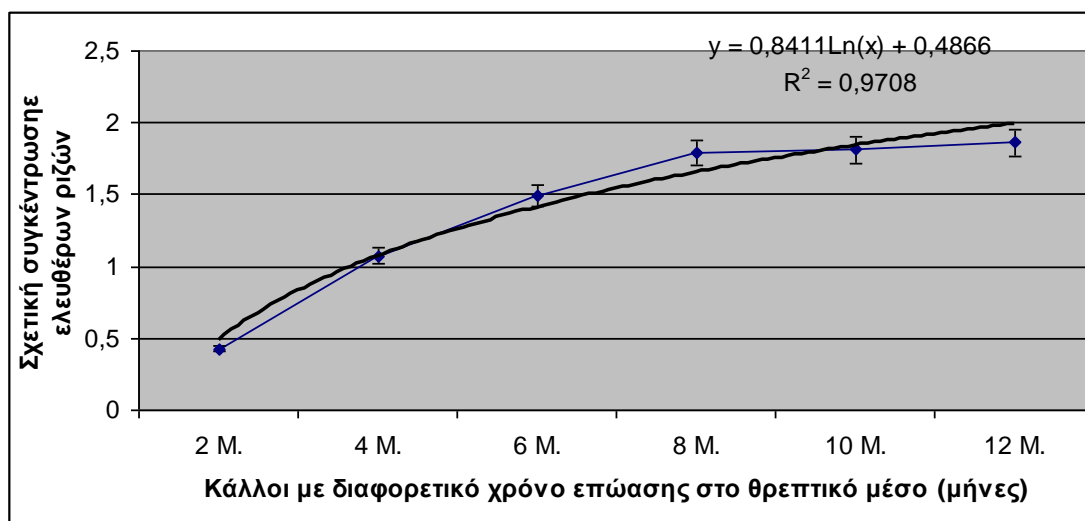
Τα δείγματα μετρούνταν σε φθορισμόμετρο (fluorescence spectrometer) με τιμή διέγερσης (excitation) 498nm και τιμή εκπομπής (emission) στα 522nm. Οι αναλύσεις έγιναν σε κάλλους ηλικίας 2 μηνών (2M), 4 μηνών (4M), 6 μηνών (6M), 8 μηνών (8M), 10 μηνών (10M) και 12 μηνών (12M).

ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΛΟΥ	Φθορισμός ROS (498-522nm)
2 Month	0,426067
4 Month	1,072967
6 Month	1,488333
8 Month	1,7915
10 Month	1,810167
12 Month	1,864167



Διάγραμμα 12 : Σχετική συγκέντρωση ελευθέρων ριζών σε κάλλους με διαφορετικό χρόνο επώασης στο θρεπτικό διάλυμα..

Γίνεται στατιστική επεξεργασία για να μελετηθεί αν η ηλικία του ιστού, επηρεάζει τη συγκέντρωση ROS. Χρησιμοποιείται ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis για να διαπιστωθεί αν τουλάχιστον 2 παρατηρήσεις διαφέρουν. Το p-value του ελέγχου είναι $p=0,009 < 0,05$, άρα απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση ότι οι διάμεσοι των παρατηρήσεων δεν διαφέρουν σημαντικά. Τα αποτελέσματα περιγράφονται με τη χρήση γραμμής τάσης.



Διάγραμμα 13 : Γραμμή τάσης της σχετικής συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών σε κάλλους με διαφορετικό χρόνο επώασης.

Παρατηρείται μία αύξηση του φορτισμού με τη πάροδο του χρόνου, υπό μορφή λογαριθμικής συνάρτησης:

$$y=0,841\text{Ln}(x) + 0,4866$$

$$R^2=0,9708$$

Στη συνέχεια γίνονται επιμέρους έλεγχοι μεταξύ των παρατηρήσεων για να διαπιστωθούν διαφορές σε σχέση με το χρόνο.

Παρατηρήσεις	Έλεγχος Mann-Whitney, p-value
2M /4M	p-value=0.050=0.05 .
4M/6M	p-value=0.050=0.05
6M/8M	p-value=0.050=0.05
8M/10M	p-value=0.513>0.05
10M/12M	p-value=0.275>0.05

Από τις τιμές προκύπτει ότι οι πληθυσμοί 2M, 4M, 6M,8M διαφέρουν οριακά μεταξύ τους. Ενώ οι πληθυσμοί 8M,10M, 12M δε διαφέρουν.

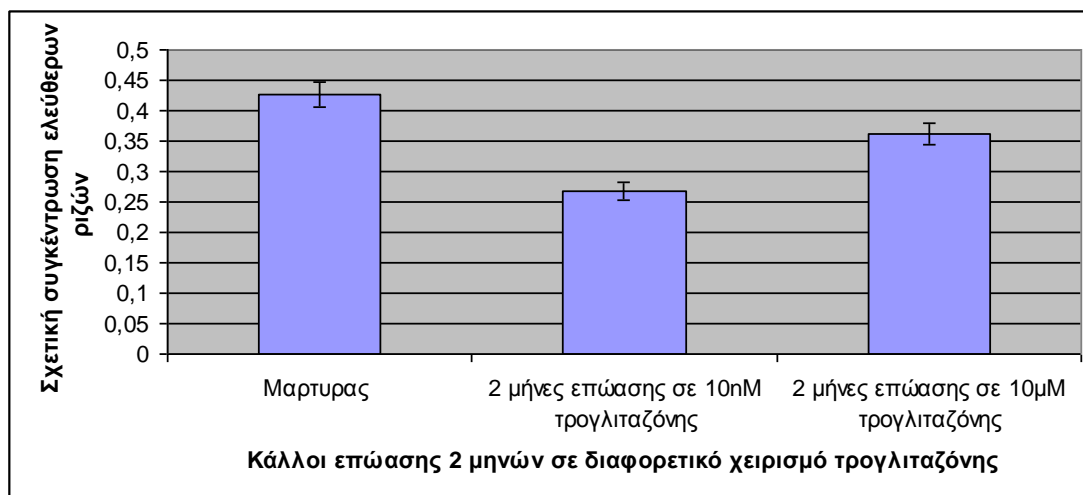
Γ.3.1 Επίδραση της τρογλιταζόνης στο σχηματισμό ROS

Ο αντιοξειδωτικός παράγοντας τρογλιταζόνη μελετάται ως προς την επίδραση του στη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας είναι τα εξής:

ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΛΟΥ	Φθορισμός ROS (498-522nm)
2M	0,426067
2 M.Tr.Nano.	0,2676
2M.Tr.Micro.	0,3616
4M	1,072966667
4M.Tr.Nano.	1,0705
4M.Tr.Micro.	1,0365

I. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης, στο σχηματισμό ROS, σε κάλους 2μηνών

Κάλλοι ηλικίας 2 μηνών έχουν δεχθεί την επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης. Παρουσιάζονται μαζί με το μάρτυρα στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί.

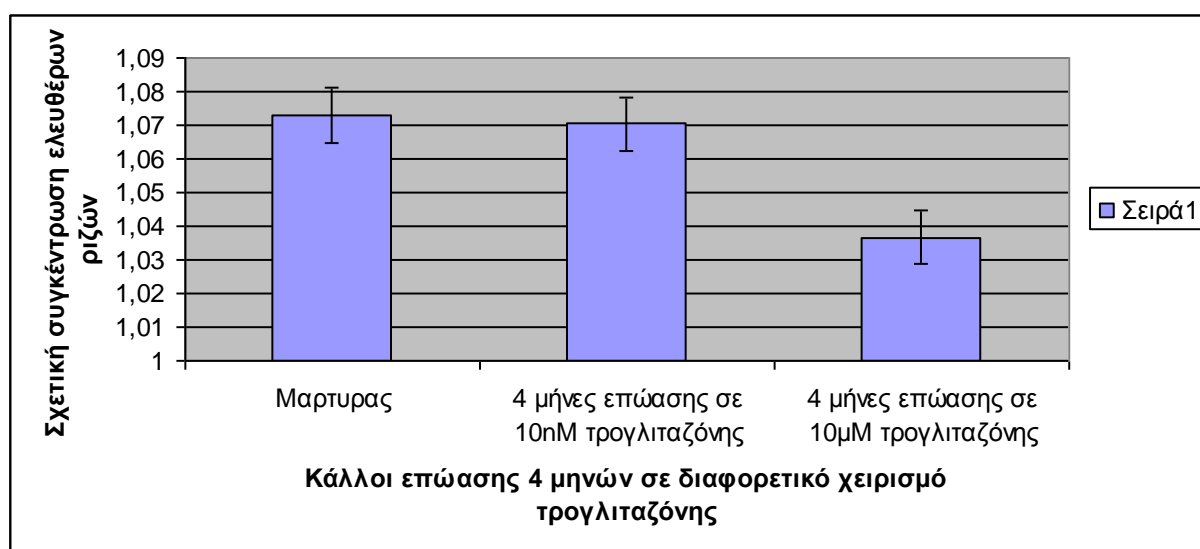


Διάγραμμα 14 : Σχετική συγκέντρωση ελευθέρων ριζών σε κάλλους επώασης 2 μηνών σε θρεπτικό διάλυμα με διαφορετικό χειρισμό τρογλιταζόνης.

- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10nM (2MTrNano) είναι : $p\text{-value}=0.050 < 0.05$, άρα οριακά δεχόμαστε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.
- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10μM (2MTrMicro) είναι: $p\text{-value}=0.050 < 0.05$, άρα οριακά δεχόμαστε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.
- Η σύγκριση μεταξύ της επίδρασης των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων 10nM και 10μM είναι : $p\text{-value}=0.050 < 0.05$, άρα οριακά δεχόμαστε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων

II. Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης, στο σχηματισμό ROS, σε κάλους 4 μηνών

Κάλλοι ηλικίας 4 μηνών έχουν δεχθεί την επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων τρογλιταζόνης. Μαζί με το μάρτυρα παρουσιάζονται στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 15: Σχετική συγκέντρωση ελευθέρων ριζών σε κάλλους επώασης 4 μηνών σε θεραπετικό διάλυμα με διαφορετικό χειρισμό τρογλιταζόνης

- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10nM (2MTrNano) είναι : $p\text{-value}=0.827 < 0.05$, άρα δεχόμαστε ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.
- Ο στατιστικός έλεγχος για την επίδραση συγκέντρωσης 10μM (2MTrMicro) είναι: $p\text{-value}=0.827 < 0.05$, άρα δεχόμαστε ότι υπάρχει δεν διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.
- Η σύγκριση μεταξύ της επίδρασης των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων 10nM και 10μM είναι : $p\text{-value}=0.513 < 0.05$, άρα δεχόμαστε ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων

III. Επίδραση ίδιας συγκέντρωσης τρογλιταζόνης, στο σχηματισμό ROS, σε κάλους ίδιας ηλικίας.

Για να μελετηθεί η δράση της τρογλιταζόνης, σε σχέση με την ηλικία του κάλλου, μελετάται η επίδραση ίδιας συγκέντρωσης της ουσίας, σε κάλους διαφορετικής ηλικίας

- Η σύγκριση της επίδρασης ίδιας συγκέντρωσης τρογλιταζόνης 10nM σε κάλλους ηλικίας 2M και 4M έχει : $p\text{-value}=0.050 < 0.05$, άρα οριακά δεχόμαστε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.
- Η σύγκριση της επίδρασης ίδιας συγκέντρωσης τρογλιταζόνης 10μM σε κάλλους ηλικίας 2M και 4M έχει : $p\text{-value}=0.050 < 0.05$, άρα οριακά δεχόμαστε ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των παρατηρήσεων.

Με βάση τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει ότι η τρογλιταζόνη επιδρά ανάλογα με την ηλικία του κάλλου. Σε νεαρότερους κάλλους έχει μεγαλύτερη επίδραση και μειώνει περισσότερο τα επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου.

Γ.4 Μορφολογικές διαφοροποιήσεις κάλλων

Οι κάλλοι που επώαστηκαν για διαφορετικό χρονικό διάστημα καθώς και αυτοί που δέχθηκαν χειρισμό με τρογλιταζόνη παρουσίασαν μορφολογικές διαφοροποιήσεις. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται στο χρώμα και τη συνεκτικότητα τους. Το χρώμα των αναπτυσσόμενων κάλλων ποικίλει από άσπρο και ελαφρύ κίτρινο έως ανοικτό καφέ. Η συνεκτικότητά τους εξελίσσεται από πολύ συνεκτικός έως εύθρυπτος ιστός.

Ο παράγοντας χρόνος, επηρέασε την εμφάνιση των κάλλων τόσο στο χρώμα όσο και στη συνεκτικότητα. Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται οι παρατηρήσεις, όπου με θετικό πρόσημο (+) υποδηλώνεται η παρουσία σε μια κατηγορία και με αρνητικό (-) η απουσία:

- Επίδρασης του χρόνου επώασης στο χρώμα των κάλλων

Χρόνος επώασης κάλλου	2M	4M	6M	8M	10M	12M
Άσπρο	+	-	-	-	-	-
Ελαφρύ Κίτρινο	++	+++	+++	+	-	-
Ανοικτό Καφε	-	-	-	++	+++	+++

- Επίδραση του χρόνου επώασης στη συνεκτικότητα των κάλλων

Χρόνος επώασης κάλλου	2M	4M	6M	8M	10M	12M
Πολύ Συνεκτικός	+++	+++	+	-	-	-
Συνεκτικός	-	-	++	+	-	-
Εύθριπτος	-	-	-	++	+++	+++

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι κάλλοι μέχρι των έκτο μήνα καλλιέργειας είναι συνεκτικοί και έχουν χρώμα ανοικτό κίτρινο. Από τον όγδοο μήνα και στη συνέχεια γίνονται εύθριπτοι και αλλάζει το χρώμα τους σε ανοικτό καφέ.

Η παρουσία τρογλιταζόνης επηρέασε το χρώμα των κάλλων ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφοροποιήσεις ως προς την συνεκτικότητα.. Η επίδραση της τρογλιταζόνης στο χρώμα παρουσιάζεται τον πίνακα..

- Επίδρασης της τρογλιταζόνης στο χρώμα των κάλλων

Χρόνος επώασης κάλλου και επέμβαση τρογλιταζόνης	2 μήνες Μάρτυρας	2 μήνες 10 nM	2 μήνες 10 μM	4 μήνες Μάρτυρας	4 μήνες 10 nM	4 μήνες 10 μM
Άσπρο	+	-	-	-	-	-
Ελαφρύ Κίτρινο	++	+++	+++	+++	+++	+++
Ανοικτό Καφε	-	-	-			

Οι κάλλοι που μεταχειρίστηκαν με τρογλιταζόνη εμφάνισαν πολύ σύντομα ελαφρύ κίτρινο χρώμα σε σχέση με το μάρτυρα, αλλά δεν εντοπίστηκε κάποια διαφοροποίηση που να σχετίζεται με τη συγκέντρωση τρογλιταζόνης και τη διάρκεια επώασης σε αυτή.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι κάλλοι που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με τρογλιταζόνη, ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της ουσίας και το χρονικό διάστημα εφαρμογής της, είχαν μικρότερο μέγεθος από τον αντίστοιχο μάρτυρα, το σχήμα τους ήταν περισσότερο σφαιρικό και μικρότερο τμήμα του κάλλου βρισκόταν σε επαφή με το υπόστρωμα.

Δ. Αποτελέσματα και Συζήτηση.

Στόχος του πειράματος είναι η μελέτη της επίδρασης των παραγόντων γήρανση και τρογλιταζόνη, στο οξειδωτικό στρες των φυτικών κυττάρων. Καλλιεργήθηκαν κάλλοι *Arabidopsis thaliana*, δημιουργώντας μια χρονοσειρά ηλικιών δύο έως δώδεκα μηνών. Παράλληλα κάλλοι δύο και τεσσάρων μηνών αναπτύχθηκαν υπό την επίδραση τρογλιταζόνης στο θρεπτικό μέσο, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για να αποτυπωθούν οι μεταβολικές διεργασίες, αποτέλεσμα της επίδρασης του χρόνου καλλιέργειας και της τρογλιταζόνης, επιλέχθηκαν ορισμένοι δείκτες. Έγιναν μετρήσεις για να υπολογισθεί είναι η ικανότητα συγκέντρωσης πρωτεϊνών, η ύπαρξη καρβονυλομάδων στις πρωτεΐνες και η συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου.

Μορφολογικά υπήρξαν διαφοροποιήσεις στους κάλλους λόγω της επίδρασης του χρόνου και της τρογλιταζόνης. Οι κάλλοι που επώαστηκαν για διαφορετικό χρονικό διάστημα, έχουν συνεκτική εμφάνιση και χρώμα ανοικτό κίτρινο μέχρι τον έκτο μήνα καλλιέργειας. Από τον όγδοο μήνα και στη συνέχεια, γίνονται εύθρυπτοι και αλλάζει το χρώμα τους σε ανοικτό καφέ.

Η παρουσία τρογλιταζόνης επηρέασε το χρώμα των κάλλων ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφοροποιήσεις ως προς την συνεκτικότητα. Σε σχέση με το μάρτυρα εμφάνισαν πολύ σύντομα ελαφρύ κίτρινο χρώμα, είχαν μικρότερο μέγεθος και το σχήμα τους ήταν περισσότερο σφαιρικό.

Η ικανότητα των κάλλων να αποθηκεύουν πρωτεΐνες διαφοροποιείται μέσα στο χρόνο και παρατηρείται μία μείωση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών υπό μορφή σιγμοειδούς καμπύλης. Από το στατιστικό έλεγχο, παρατηρείται ότι για τους πρώτους 4 μήνες η περιεκτικότητα των κάλλων σε πρωτεΐνες δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Στη συνέχεια, κατά τον έκτο μήνα και όγδοο μήνα η συγκέντρωση μειώνεται έντονα και στη συνέχεια οι όποιες αποκλίσεις παρουσιάζονται δεν διαφέρουν στατιστικά. Δηλαδή, το κρίσιμο χρονικό διάστημα όπου παρουσιάζεται έντονη πτώση της συσσώρευσης πρωτεϊνών εντοπίζεται μεταξύ του τέταρτου και όγδοου μήνα καλλιέργειας.

Η επίδραση της τρογλιταζόνης στην ποσότητα πρωτεϊνών, σχετίζεται τόσο με την ηλικία του ιστού όσο με την συγκέντρωση της ουσίας στο θρεπτικό μέσο. Σε κάλλους δύο μηνών παρατηρείται σημαντική αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου,

ανεξάρτητα από την συγκέντρωση της ουσίας. Σε κάλους τεσσάρων μηνών, επιδρά μόνο η μικρή συγκέντρωση τρογλιταζόνης (10 nM) και παρουσιάζεται αύξηση των πρωτεϊνών. Σε κάλους διαφορετικής ηλικίας, η επίδραση ίδιας ποσότητας τρογλιταζόνης έχει σαν αποτέλεσμα να παράγονται περισσότερες πρωτεΐνες στους νεότερους κάλους.

Η περιεκτικότητα των ιστών σε πρωτεϊνικά καρβονύλια διαφέρει με τη πάροδο του χρόνου. Παρατηρείται μια εκθετική αυξητική τάση στη πορεία συσσώρευσης καρβονυλίων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην παρουσία πρωτεϊνικών καρβονυλίων απαντώνται στο διάστημα μεταξύ έξι μηνών και οκτώ μηνών καλλιέργειας. Στη συνέχεια η εξέλιξη της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών δεν παρουσιάζει στατιστικά μεγάλες διαφορές.

Η εφαρμογή τρογλιταζόνης σε κάλους ηλικίας 2 μηνών, έχει αντιοξειδωτική συμπεριφορά ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της στο θρεπτικό μέσο. Αντίθετα, σε κάλους τεσσάρων μηνών δεν παρατηρήθηκε αντιοξειδωτική επίδραση από την παρουσία της ουσίας. Η επίδραση της τρογλιταζόνης σχετίζεται τόσο με την ηλικία του ιστού όσο και με την συγκέντρωση της. Σε συγκέντρωση 10nM, επιδρά το ίδιο, σε κάλους διαφορετικής ηλικίας, ενώ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση 10μM, η αντιοξειδωτική της δράση αλλάζει.

Η ηλικία του ιστού, επηρεάζει τη συγκέντρωση ROS καθώς παρατηρείται μία αύξηση του φθορισμού με τη πάροδο του χρόνου, υπό μορφή λογαριθμικής συνάρτησης. Για κάθε δίμηνο καλλιέργειας και μέχρι τον όγδοο μήνα, η συγκέντρωση των ενεργών ριζών οξυγόνου αυξάνει, ενώ στη συνέχεια σταθεροποιείται.

Ο αντιοξειδωτικός παράγοντας τρογλιταζόνη επέδρασε στη παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά σε σχέση με την ηλικία του ιστού. Σε κάλους δύο μηνών η αντιοξειδωτική δράση αυξάνει όταν εφαρμόζεται η μικρότερη συγκέντρωση ουσίας. Αντίθετα σε κάλους τεσσάρων μηνών δεν παρατηρείται αντιοξειδωτική δράση.

Ο παράγοντας ηλικία, επιδρά στις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων και στο οξειδωτικό στρες. Παρατηρείται, ότι υπάρχει ένα κρίσιμο διάστημα μεταξύ του έκτου και όγδοου μήνα καλλιέργειας, όπου επηρεάζεται η ικανότητα παραγωγής πρωτεϊνών και η παρουσία καρβονυλίων σε αυτές (οξειδωση). Σε νεαρότερους ή γηραιότερους ιστούς δεν παρουσιάζονται σημαντικές μεταβολές. Η παρουσία ενεργών μορφών οξυγόνου αυξάνει σταθερά μέχρι τον όγδοο μήνα. Στο σημείο αυτό,

παρατηρείται μια κρίσιμη καμπή των μεταβολών και στη συνέχεια ομαλοποιείται η εξέλιξη της διαδικασίας.

Η τρογλιταζόνη επιδρά ανάλογα με την ηλικία του κάλλου και σε δεύτερο επίπεδο εξαρτάται από τη συγκέντρωση της. Επιδρά θετικά στη παραγωγή πρωτεϊνών και έχει αντιοξειδωτική δράση σε νεαρούς κάλλους, ενώ η εφαρμογή συγκέντρωσης 10 nM δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Αντίστοιχα αποτελέσματα λαμβάνονται και από την επίδραση της σε ενεργές μορφές οξυγόνου. Επιδρά σε νέους κάλλους και τα καλύτερα αποτελέσματα τα δίνει η μικρότερη εφαρμοζόμενη συγκέντρωση.

Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου έχουν ένα δυναμικό και σύνθετο ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων. Έχουν γίνει πολλές μελέτες προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος τους στον μεταβολισμό και η επίδραση τους σε μορφολογικά χαρακτηριστικά. Καλλιέργεια διαγονιδιακών φυτών σε χαμηλά επίπεδα ROS προκάλεσε μείωση στη κυριαρχία της κορυφής, ενισχύθηκε η ανάπτυξη πλάγιων βλαστών, μειώθηκε το επίπεδο χλωροφύλλης και παρουσιάστηκαν ανωμαλίες στην άνθηση. (Bulgakov et al, 2012). Σε πειράματα πάνω σε σόγια, αραβίδοψη και καπνό, η παρουσία μορίων που ενισχύουν την παραγωγή ROS, είχε επιπτώσεις στα μιτοχόνδρια, όπου παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλαγές και αλλοιώσεις στη λειτουργία τους (Yoshinaga et al, 2005). Σε κάλλους καπνού η μείωση των ενεργών ριζών οξυγόνου ενισχύει τη βιοσυνθετική οδό των αλκαλοειδών, (Sachan et al, 2010). Ο έλεγχος της σχέσης μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων σε ένα φυτικό οργανισμό, παρέχει τη δυνατότητα επίδρασης στα μεταβολικά μονοπάτια. Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς, ώστε να ρυθμίζουν τη παρουσία ενεργών ριζών οξυγόνου σε επίπεδα που είναι απαραίτητα για τις μεταβολικές διεργασίες. Τέτοιοι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι είτε ενζυμικής φύσεως είτε βιομόρια όπως το ασκορβικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, καροτενοειδή και φλαβονοειδή (Foyer and Noctor, 2000).

Παρουσιάζει ενδιαφέρον η δυνατότητα επίδρασης στο οξειδωτικό στρες των φυτών, μέσω της εφαρμογής μορίων που ενεργοποιούν οξειδωτικές ή αντιοξειδωτικές διεργασίες. Παρατηρήθηκε, ότι η εφαρμογή αντιοξειδωτικών ουσιών όπως αμπισικό οξύ και οξείδιο του αζώτου, μπορεί να ρυθμίζει την ανθεκτικότητα των φυτών στην αλατότητα (Wang et al, 2010). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου έχει χρησιμοποιηθεί σε μεταχειρίσεις έκφυτων γλυκοπατάτας και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ευνοεί την ανάπτυξη των ριζών (Deng et al, 2012). Επίσης, ενισχύει την άμυνα φυτών σε

συνθήκες στρες, λόγω περιβαλλοντικών καταπονήσεων, από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή ένταση φωτισμού, αλατότητα και ξηρασία (Chao et al, 2010). Σε in vitro καλλιέργεια φυτών *Arabidopsis thaliana*, η εξωγενής εφαρμογή τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) επιδρά στην διαφοροποίηση κυττάρων των ριζών (Henmi et al, 2005). Η χρήση αμινοτριαζόλης (αναστολέας της καταλάσης) προκαλεί αναστολή της βιοσύνθεσης αιθυλενίου (Altman and Solomos, 1992). Η παρουσία ATP και α-τοκοφερόλης, σε καλλιέργεια αγγουριού σε βιοαντιδραστήρα, επηρέασε θετικά την ανάπτυξη έκφυτων και γενικότερα η παρουσία χαμηλών επιπέδων ROS σχετίστηκε με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Matakiadis and Kintzios, 2005). Η λειτουργία των ROS, ως ρυθμιστές ανάπτυξης φυτικών κυττάρων, ερευνήθηκε σε φυτά *Spirodela polyrrhiza*, όπου παρατηρήθηκε διέγερση της κυτταρικής ανάπτυξης από τις ελεύθερες ρίζες (Moschoroulou et al, 2007).

Οι οξειδωτικές διαδικασίες έχουν άμεσο ρόλο στην ανάπτυξη in vitro. Η ανάπτυξη των ιστών καθορίζεται από την εφαρμογή εξωγενών ρυθμιστών ανάπτυξης, που επηρεάζουν τον πρωτογενή οξειδωτικό μεταβολισμό και δρουν άμεσα στα μεταβολικά μονοπάτια των φυτοορμονών, στα οποία συμμετέχουν ενεργές ρίζες οξυγόνου (Benson et al, 1997). Τα δεδομένα του πειράματος δείχνουν ότι η παρουσία τρογλιταζόνης στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης καλλών, προκαλεί διαφοροποιήσεις στην βιοσύνθεση μορίων και επηρεάζει τις κυτταρικές οξειδωτικές διεργασίες. Η εφαρμογή της ουσίας σε νεαρούς, αδιαφοροποίητους κάλλους, έχει θετική επίδραση στη παραγωγή πρωτεϊνών και μειώνει τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και ενεργών ριζών οξυγόνου. Πρέπει να σημειωθεί η δράση της τρογλιταζόνης έχδει μελετηθεί μόνο σε ζωικούς οργανισμούς in vivo και in vitro, ενώ έχει συχνά αναφερθεί η εμπλοκή της, θετική ή/και αρνητική, στη μιτοχονδριακή ομοιόσταση (Yokoi, 2010). Κάτω από αυτό το πρίσμα, η παρούσα μελέτη είναι πρωτότυπη και δυνητικά εφαρμόσιμη προς την κατεύθυνση της βελτίωσης πρωτοκόλλων ιστοκαλλιέργειας φυτών. Περαιτέρω έρευνα, για τον τρόπο δράσης της τρογλιταζόνης στον κυτταρικό μεταβολισμό και την επίδραση που μπορεί να έχει στη κυτταρική διαφοροποίηση, είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της ουσίας ως παράγοντα καλλογένεσης.

E. Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Altman A. and Solomos Th.** (1994) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(2):282–287.: Inhibition of Ethylene Biosynthesis and Action in Cut Carnations (*Dianthus caryophyllus* L.) by Aminotriazole.
- Benson E.E., Magill W.J. and Bremner D.H.** (1997) *Phyton (Austria)* Special issue:"Free Radicals" Vol. 37 Fasc. 3 (31)-(38). Free Radical Processes in Plant Tissue Cultures:Implications for Plant Biotechnology Programmes
- Bradford, M. M.** (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248
- Bulgakov P., Gorpenchenko Y., Veremeichik N., Shkryl N., Tchernoded.K., Bulgakov V, Aminin L., and Zhuravlev N.** (2012) *Plant Physiology.* Vol. 158, pp. 1371–1381: The rolB Gene Suppresses Reactive Oxygen Species in Transformed Plant Cells through the Sustained Activation of Antioxidant Defense
- Deng Xi-Ping, Cheng Yu-Jie, Wu Xiao-Bing, Kwak Sang-Soo, Chen Wei and Eneji A. E.**(2002). *AJCS* 6(11):1572-1578 : Exogenous hydrogen peroxide positively influences root growth and exogenous hydrogen peroxide positively influences root growth and metabolism in leaves of sweet potato seedlings
- Foyer C. H. and Noctor, G.** (2000) *New Phytol.* 146: 359-388.Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling
- Gallego S. M., Kogan M. J., Azpilicueta C. E., Pen C. and Tomaro M.L.** (2005).*Plant Growth Regulation* 46:267–276
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968). *Exp Cell Res.* 50: 151-158.Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.
- Chao Yun-Yang ., Chao-Yeh Chen ., Wen-Dar Huang., Ching Huei Kao** (2010) *Plant Soil* 329:327–337: Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves
- Ghosh S, Patel N, Rahn D, McAllister J, Sadeghi S, Horwitz G, Berry D, Wang KX, Swerdlow RH** (2007) *Mol Pharmacol* 71:1695–1702: The Thiazolidinedione Pioglitazone Alters Mitochondrial Function in Human Neuron-Like Cells
- Harman, D.** (1956).. *J. Gerontol.* 2: 298–300. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry
- Henmi K., Demura T., Tsuboi S., Fukuda H., Iwabuchi M. and Ogawa K** (2005) *Plant Cell Physiol.* 46(11): 1757–1765 :Exogenously applied GSH and GSSG can control the in vitro differentiation of mesophyll cells Arabidopsis Change in the Redox State of Glutathione Regulates Differentiation of Tracheary Elements in Zinnia Cells and Arabidopsis Roots.
- León J.** (2008). *Plant Signaling & Behavior* 3:9, 671-673: Peroxisome proliferation in Arabidopsis

Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G. , Whan Ahn B.-, Shaltiel, S. and Stadtman E. R. (1990). *METHODS IN ENZYMOLOGY*, VOL. 186,: Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins

Loewenberg, J. R. (1965) *Arabidopsis Inf: Sen.* 2,34. Callus cultures of *Arabidopsis*.

Matakiadis Th. and Kintzios S. (2005) *Plant Growth Regulation*:1–12 : The effect of ATP on cucumber (*Cucumis sativus* L.) regeneration from nodal 2 explants: association with a-tocopherol, H₂O₂ and size of culture vessel

Mathur J. and Koncz C. (1998) *Methods in Molecular Biology, Vol. 82: Arabidopsis Protocols : Callus Culture and Regeneration*

Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998) *Science*:.282(5389):662, 679-82. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis.

Moschopoulou G., Papanastasiou I, Makri O., Lambrou N., Economou G., Soukouli K., Kintzios S. (2007) *Plant Cell Rep* 26:2063–2069: Cellular redox-status is associated with regulation of frond division in *Spirodela polyrrhiza*.

Müller A., Iser M. & Hess D. (2001). *Transgenic Research* 10: 435–444,. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a Non meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker

Sachan N., Rogers D., Yun K.Y., Littleton J., Falcone D. (2010) *Plant Cell Rep* 29:437–448 : Reactive oxygen species regulate alkaloid metabolism in undifferentiated *N. tabacum* cells

Shacter E (2000). *DRUG METABOLISM REVIEWS*, 32(3&4), 307–326
Quantification and significance of protein oxidation in biological samples

Smith R.H. (2000)“. *Plant Tissue Culture, Second Edition: Techniques and Experiment*

Stadtman E. R. and Berlett B. S. (1997). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 272, No. 33, Issue of August 15, pp. 20313–20316,: Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress

Valvekens D, Van Montagu M., and Van Lijsebettens M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:Vol. 85, pp. 5536-5540, :*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection

Wang H., Liang X., Huang J., Zhang D., Lu H., Liu Z. and Yurong B. (2010) *Plant Cell Physiol* 51(10): 1754–1765. Involvement of Ethylene and Hydrogen Peroxide in Induction of Alternative Respiratory Pathway in Salt-Treated *Arabidopsis* Calluses

Yokoi T. (2010) *Handb Exp Pharmacol.* 196:419-35. Troglitazone.

Yoshinaga K., Arimura Sh., Niwa Y., Tsutsumi N., Uchimiya H. and Kawai-Yamada M. (2005) *Annals of Botany* 96: 337–342. Mitochondrial Behaviour in the Early Stages of ROS Stress Leading to Cell Death in *Arabidopsis thaliana*.