



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Διδακτορική διατριβή

Μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων γηγενών
ποικιλιών οίνου, σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα με τη
χρήση μοριακών τεχνικών

Φώτιος Τέκος

Βιοχημικός και Βιοτεχνολόγος

Λάρισα, Μάρτιος 2023

Μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων γηγενών ποικιλιών οίνου,
σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα με τη χρήση μοριακών τεχνικών.

Study of the biological activity of extracts derived from indigenous wine
varieties using *in vitro* and *in vivo* molecular techniques.

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε και χρηματοδοτήθηκε στο πλαίσιο της εμβληματικής δράσης ‘Οι Δρόμοι των Αμπελώνων’



Καθώς και από τη δράση ‘Έρευνώ – Δημιουργώ – Καινοτομώ’ και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) με κωδικό Έργου Τ1ΕΔΚ-01889



Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σέρκος Χαρουτουνιάν: Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Πρόεδρος του ΔΣ του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

Κωνσταντίνος Πουλάς: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σέρκος Χαρουτουνιάν: Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Πρόεδρος του ΔΣ του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ.

Κωνσταντίνος Πουλάς: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Ιωάννης Ταϊτζόγλου: Καθηγητής Φυσιολογίας των Ζώων, Σχολή Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ιωάννης Γιαβάσης: Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων και Μικροβιακών Ζυμώσεων, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αντώνιος Γιακουντής: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας - Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Αριστείδης Βεσκούκης: Επίκουρος Καθηγητής Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

“Εάν αποσυνθέσεις την Ελλάδα, στο τέλος θα δεις να σου απομένουν μια ελιά, ένα
αμπέλι κι ένα καράβι. Που σημαίνει: με άλλα τόσα την ξαναφτιάχνεις”

Οδυσσέας Ελύτης
1911-1996

Ευχαριστίες



Η διδακτορική αυτή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο φυσιολογίας ζωικών οργανισμών, από τον Μάρτιο του 2020 έως τον Μάρτιο του 2023.

Αρχικά θα πρέπει να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Δημήτρη Κουρέτα. Δίχως αυτόν δεν θα είχα αγαπήσει τον κόσμο της Τοξικολογίας και της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας και δεν θα είχα πραγματοποιήσει το παρόν διδακτορικό. Δεν είναι οι ατελείωτες ώρες στον πάγκο που θα θυμάμαι μετά από χρόνια, αλλά οι ατελείωτες συζητήσεις γύρω από επιστημονικά, φιλοσοφικά, πολιτικά, κοινωνικά, περιβαλλοντικά, επαγγελματικά και πάντα επίκαιρα θέματα. Αυτά δεν θα τα ξεχάσω ποτέ, και σε έναν βαθμό αποτελούν ένα μέρος αυτού που είμαι σήμερα. Ελπίζω να έχω την ευκαιρία να τα μεταφέρω και εγώ σε δικά μου «επιστημονικά παιδιά», συνεχίζοντας το επιστημονικό γενεαλογικό δέντρο μας. Έχουμε ανταλλάξει 7.866 emails μέχρι και το τέλος Ιανουαρίου και σίγουρα ήδη έχουν αυξηθεί μερικές εκατοντάδες. Μου μάθατε να είμαι ερευνητής και να μην κρατάω στο συρτάρι την γνώση που ανακαλύπτω. Έτσι ξεκίνησε και η FoodOxys, μια ιδέα που έγινε πραγματικότητα και ελπίζω και πιστεύω ότι θα πάει πολύ ψηλά. Και εδώ ένα μεγάλο ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη της διαχείρισης της εταιρείας από την 1^η ημέρα μέχρι και σήμερα και σε μια ηλικία ούτε 24 ετών. Ελπίζω οι ιδέες μας να ταξιδεύουν σε όλο τον κόσμο, όπως η νέα μας εταιρεία Olea Fortius. Έχουμε πολλά να κάνουμε ακόμα και θα τα προλάβουμε!

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, κ. Χαρουτουνιάν Σέρκο, που με έφερε κοντά σε έναν κόσμο φυσικών προϊόντων και των εξαιρετικής ποιότητας πρώτων υλών που οδηγούν σε απίστευτα αποτελέσματα. Ακόμα ένα ευχαριστώ στον κ. Πουλά Κωσταντίνο, που μου έμαθε να υπερασπίζομαι επιστημονικά αυτά που πρεσβεύω και πιστεύω. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, κ. Ταϊτζόγλου Ιωάννη, που μου δίδαξε την διαδικασία χειρισμού των πειραματόζωων και για όλη τη βοήθεια στη εκτέλεση των αντίστοιχων πειραμάτων. Ένα ακόμα ευχαριστώ στον κ. Γιακουντή

Αντώνη, για τις εξαιρετικά χρήσιμες γνώσεις που μου παρείχε σχετικά με τις κυτταροκαλλιέργειες. Επιπλέον, ευχαριστώ τον κ. Γιαβάση Ιωάννη, που μου έδειξε διαδικασίες γύρω από την καλλιέργεια και την τεχνολογία της οινοποίησης. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Βεσκούκη Αριστείδη, που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια του διδακτορικού και συζητούσαμε διάφορα επιστημονικά ζητήματα.

Τίποτα από το διδακτορικό αυτό δεν θα ήταν το ίδιο, και κυρίως στις αναμνήσεις μου χωρίς τους συναδέλφους και φίλους του εργαστηρίου. Ζωή Βασιλική Σκαπέρδα, δεν θα γράψω τίποτα, δεν χρειάζεται, αλλά σε ευχαριστώ για όλες τις φορές που γελάσαμε, μαλώσαμε και ξαναγελάσαμε. Μαζί με τα υπόλοιπα παιδιά, έχουμε πολλά να κάνουμε ακόμα! Περικλή Βαρδάκα και Μαρία Νεχαλιώτη σας ευχαριστώ για όλη την βοήθεια τόσο στο εργαστήριο όσο και στην εταιρεία μας. Lab Manager Σωτηρίνα Μακρή και συνάδελφε Μαρία Κούρτη και Καλλιρρόη Τεριζή σας ευχαριστώ για όλη τη συνεργασία και την βοήθεια. Ευχαριστώ ακόμα όλους όσους συνεργαστήκαμε και φύγατε Γιάννη Κυριαζή, Ελένη Βάσση, Νίκο Γκουτζουρέλα, Βασίλη Κοτσικόρη. Φίλε Θάνο Τσιώρα, σε ευχαριστώ για όλη τη βοήθεια και για όλα τα προγράμματα που τρέξαμε μαζί. Ευχαριστώ επίσης και όλα τα παιδιά που συνεργαστήκαμε για την πτυχιακή τους εργασία Ιωάννα Μελέτη, Δέσποινα Κυριαζή, Δήμητρα Παχύ, Χρήστο Αγγελάκη, Θάνο Καρανίκα, Μαργκώ Σαϊτη, Μαρία Γκασδρόγκα, Αναστασία Τσακιρίδου, Ευδοκία Μπεντικούγια, Κυριακή Ξίφτου.

Αναστασία Πατούνα, σε ευχαριστώ για όλη την υπομονή που μου έδειξες όλα τα χρόνια του διδακτορικού.

Τέλος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου. Τους γονείς μου, Γρηγόρη και Βάγια, για τη στήριξη όλα αυτά τα χρόνια, ψυχολογική, οικονομική, ουσιαστική. Είμαι αυτός που είμαι επειδή έτσι με μεγαλώσατε, και σας ευχαριστώ για όλα! Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην αδελφή μου Αναστασία, πάντα δίπλα μου σε όλα, σίγουρα η πιο μεγάλη μου θαυμάστρια. Τέλος, ένα επιπλέον ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της ευρύτερης οικογένειας μου, Αναστάσιο, Κυριακή, Βασίλη, Μαρία, Γιώργο και Κυριακή. Παππού, σε ευχαριστώ για όλα όσα μου έμαθες και με κάνουν αυτόν που είμαι σήμερα.

Σας ευχαριστώ βαθύτατα όλους!

Διδακτορική διατριβή

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βιόπολις, Λάρισα

Διδακτορική διατριβή

Μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων γηγενών ποικιλιών οίνου,
σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα με την χρήση μοριακών τεχνικών

Φώτιος Τέκος

Βιοχημικός και Βιοτεχνολόγος BSc

Τοξικολόγος MSc

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 28

Συνολικός αριθμός σελίδων: 353

Συνολικός αριθμός λέξεων: 82.293

Συνολικός αριθμός εικόνων: 106

Συνολικός αριθμός πινάκων: 54

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 608

Περίληψη

Ο οίνος αποτελεί σημαντικό στοιχείο της Ελληνικής και παγκόσμιας διατροφής και είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την κουλτούρα, την παράδοση και την καθημερινότητα των ανθρώπων εδώ και χιλιάδες χρόνια. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει αναδείξει τις ευεργετικές ιδιότητες των οίνων και των εκχυλισμάτων τους, ωστόσο είναι εξαιρετικά μικρός ο αριθμός των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί σε Ελληνικές ποικιλίες. Με βάση τα παραπάνω, στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένη και ολιστική αξιολόγηση της βιοδραστικότητας τεσσάρων Ελληνικών ποικιλιών οίνου και εκχυλισμάτων που προέκυψαν από αυτούς σε πολλαπλά επίπεδα ελέγχου και ειδικότερα σε *in vitro* cell-free, *in vitro* cell-based και *in vivo* συστήματα, μέσω μίας συγκεκριμένης και έγκυρης μεθοδολογικής προσέγγισης. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε ο οίνος και τα εκχυλίσματα οίνου των ποικιλιών Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα διαθέτουν πλούσια πολυφαινολική σύσταση και ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Σε κυτταρικό επίπεδο παρατηρήθηκε προστασία των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες, την οξειδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, καθώς και αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε διάφορες συγκεντρώσεις, κυτταρικούς τύπους και ποικιλίες εκχυλίσματος οίνου. Σε ό,τι αφορά το *in vivo* πείραμα, οι επίμυες που κατανάλωσαν το εκχύλισμα Ξινόμαυρου εμφάνισαν ιστοειδικά ευεργετικά αποτελέσματα, εύρημα που παρατηρείται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με την ελληνική ποικιλία Ξινόμαυρο. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να βοηθήσουν στην αύξηση της προστιθέμενης αξίας των ελληνικών οίνων και να συμβάλλουν στην ενίσχυση της ανταγωνιστικότητάς τους σε διεθνές επίπεδο. Παράλληλα, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να συνεισφέρει ώστε να μελετηθούν εύκολα και γρήγορα οι ελληνικές αλλά και διεθνείς ποικιλίες, ώστε να αξιολογηθούν και να συγκριθούν μεταξύ τους αναδεικνύοντας τις ιδιαιτερότητες και τις βιολογικές δράσεις της τους στην προάσπιση της υγείας και της ευεξίας του ανθρώπου.

Abstract

Wine is a principal component of Greek and global diet, and has been inextricably linked to the culture, tradition, and everyday life of humans over thousands of years,. Numerous studies have demonstrated the beneficial properties of wines and extracts generated from them, however, the existence of such investigations in Greek wine varieties are scarce. Based on the above, in the present PhD thesis, a thorough and holistic assessment of the bioactivity of four emblematic Greek wine varieties in *in vitro* cell-free, *in vitro* cell-based, and *in vivo* models was conducted, based on a reliable and well-established methodological approach. More specifically, the biological effects of wine samples and extracts of Xinomavro, Agiorgitiko, Assyrtiko, and Malagouzia grape varieties were evaluated. According to the results, the examined samples were characterized by high polyphenolic content and exerted potent antioxidant and antimutagenic activities. Furthermore, the results from the cell-based systems showed that the examined samples acted protectively against the detrimental effects of free radicals, by confining lipid and protein oxidation and by increasing the antioxidant capacity at different concentrations and cell lines, depending on the varieties. Concerning the *in vivo* results, the consumption of the Xinomavro extract induced both beneficial and harmful outcomes on the redox status of Wistar rats, depending on the tissue. It is worth mentioning that this investigation was the first one in the international literature to evaluate the biological effects of wine and extracts from the Greek Xinomavro variety. The obtained findings could offer valuable insight towards the enhancement of the added value of Greek wines, thus enhancing their competitiveness at the international level. Concomitantly, the methodological approach introduced herein can be considered a useful tool for the easy and rapid assessment of the antioxidant properties of Greek and other wine varieties, and their individual role in the protection of human health and well-being.

*Στους γονείς μου,
Γρηγόρη και Βάγια
Στην αδελφή μου,
Αναστασία*

Κατάλογος περιεχομένων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	- 4 -
ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	- 4 -
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ - 6 -	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ - 9 -	
ABSTRACT - 10 -	
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	- 17 -
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	- 21 -
ΠΡΟΛΟΓΟΣ - 23 -	
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	- 26 -
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 29 -
1.1 ΟΙΝΟΣ.....	- 29 -
1.1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	- 29 -
1.1.2 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΟΝ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ.....	- 31 -
1.1.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΤΗΝ ΑΡΧΑΙΑ ΕΛΛΑΔΑ.....	- 32 -
1.1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΟΙΝΩΝ.....	- 33 -
1.1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΟΙΝΟΥ	- 34 -
1.1.6 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	- 36 -
1.1.6.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	- 38 -
1.1.6.2 ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ	- 38 -
1.1.7 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΟΙΝΟΥ.....	- 38 -
1.1.7.1 ΝΕΡΟ	- 39 -
1.1.7.2 ΣΑΚΧΑΡΑ	- 39 -
1.1.7.3 ΑΛΚΟΟΛΕΣ.....	- 39 -
1.1.7.4 ΟΞΕΑ.....	- 40 -
1.1.7.5 ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ.....	- 40 -
1.1.7.6 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	- 41 -
1.1.7.7 ΑΕΡΙΑ	- 41 -
1.1.7.8 ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΚΑΙ ΒΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΜΙΝΕΣ	- 42 -
1.1.7.9 ΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	- 42 -
1.1.8 ΟΙΝΟΠΟΙΗΤΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.....	- 43 -
1.1.8.1 ΕΡΥΘΡΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ.....	- 43 -
1.1.8.1.1 ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ	- 43 -
1.1.8.1.2 ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ.....	- 44 -
1.1.8.2 ΛΕΥΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ.....	- 45 -
1.1.8.2.1 ΑΣΥΡΤΙΚΟ.....	- 45 -
1.1.8.2.2 ΜΑΛΛΑΓΟΥΖΙΑ.....	- 46 -
1.1.8.3 ΠΟΠ – ΠΓΕ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	- 47 -
1.1.9 ΤΟ ΑΜΠΕΛΙ ΚΑΙ ΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ	- 48 -
1.1.10 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ	- 51 -
1.1.11 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΠΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΤΑΙ ΤΟ ΑΜΠΕΛΙ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΟΥ	- 53 -
1.2.1 ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ	- 58 -
1.2.2 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	- 61 -
1.2.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ.....	- 62 -
1.2.3.1 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	- 62 -
1.2.3.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ.....	- 63 -
1.2.3.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΘΕΙΟΥ ΚΑΙ ΧΛΩΡΙΟΥ.....	- 65 -
1.2.4 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ROS ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	- 66 -
1.2.4.1 ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	- 66 -

1.2.4.2	ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	- 69 -
1.2.5	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	- 70 -
1.2.5.1	ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ - ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΒΛΑΒΩΝ ΣΕ ΔΟΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	- 70 -
1.2.5.1.1	ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ.....	- 71 -
1.2.5.1.2	ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	- 72 -
1.2.5.1.3	ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ.....	- 73 -
1.2.5.2	ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	- 74 -
1.2.6	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	- 75 -
1.2.6.1	ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	- 78 -
1.2.6.1.1	ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ.....	- 78 -
1.2.6.1.2	ΚΑΤΑΛΑΣΗ.....	- 79 -
1.2.6.1.3	ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	- 79 -
1.2.6.1.4	ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	- 79 -
1.2.6.2	ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	- 80 -
1.2.6.2.1	ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ	- 80 -
1.2.6.2.2	ΒΙΤΑΜΙΝΗ C (ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ).....	- 81 -
1.2.6.2.3	ΒΙΤΑΜΙΝΗ E (Α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ)	- 81 -
1.2.6.2.4	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	- 82 -
1.2.6.2.4.1	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΟΙΝΟΥ.....	- 82 -
1.2.6.2.5	ΟΥΒΙΚΙΝΟΛΗ ΣΥΝΕΝΖΥΜΟ Q.....	- 86 -
1.2.6.2.6	ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	- 86 -
1.2.7	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	- 86 -
1.2.8	ΤΟ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ NRF2-KEAP1.....	- 91 -
1.2.9	Η ΜΕΣΟΛΑΒΗΣΗ ΤΗΣ ΟΔΟΥ NRF2-KEAP1 ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ	- 94 -
1.2.10	Η ΟΔΟΣ NRF2-KEAP1 ΚΑΙ Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	- 95 -
1.2.11	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ NRF2 ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	- 95 -
1.2.12	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ NRF2-KEAP1	- 95 -
2	ΣΚΟΠΟΣ.....	- 97 -
3	1 ^ο ΕΠΙΠΕΔΟ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ. ΈΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ <i>IN VITRO</i> ΤΕΧΝΙΚΩΝ	- 100 -
3.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	- 100 -
3.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 102 -
3.2.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ FOLIN-CIOCALTEU	- 102 -
3.2.2	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ DPPH [•]	- 103 -
3.2.3	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ ABTS ^{•+}	- 105 -
3.1.1	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΝΑ ΑΝΑΓΟΥΝ ΤΟΝ ΤΡΙΣΘΕΝΗ ΣΙΔΗΡΟ ΣΕ ΔΙΣΘΕΝΗ (ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΙΣΧΥΣ – REDUCING POWER).	- 107 -
3.2.4	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ O ₂ ^{•-} .	- 109 -
3.2.5	ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΙΣ ΡΙΖΕΣ ΠΕΡΟΞΥΛΙΟΥ (ROO [•]) ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΩΝ ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA	- 111 -
3.2.6	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΧΑΛΚΟΥ (CUPRAC ASSAY) ..	- 112 -
3.2.7	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 114 -
3.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 115 -

3.2.1	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ	- 115 -
3.2.2	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΑ ΑΝΑΓΟΥΝ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΡΙΖΑ DPPH	- 117 -
3.2.4	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (REDUCING POWER)	- 121 -
3.3	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 129 -
4	2ο ΕΠΙΠΕΔΟ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ. ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ <i>IN VITRO</i> ΤΕΧΝΙΚΩΝ.	- 135 -
4.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	- 135 -
4.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 137 -
4.2.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ	- 137 -
4.2.2	ΑΝΑΛΥΣΗ UHPLC-ESI-TRIPLETOF-HRMS & ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ.	- 137 -
4.2.3	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ OH•	- 138 -
4.2.4	ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ AMES.....	- 140 -
4.2.5	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 144 -
4.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 146 -
4.3.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ	- 146 -
4.3.2	ΑΝΑΛΥΣΗ UHPLC-ESI-TRIPLETOF-HRMS ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ.....	- 146 -
4.3.3	<i>IN VITRO</i> ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ - 150 -	- 150 -
4.3.3.1	ΟΛΙΚΟ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΟΥ (TPC).....	- 150 -
4.3.3.2	ΈΛΕΓΧΟΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	- 150 -
4.3.3.3	ΑΝΤΙΓΕΝΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ	- 152 -
4.3.3.4	ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ.....	- 153 -
4.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 154 -
5	3ο ΕΠΙΠΕΔΟ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ. ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	- 161 -
5.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	- 161 -
5.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 163 -
5.2.1	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	- 163 -
5.2.1.1	ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	- 163 -
5.2.1.2	ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HepG2	- 163 -
5.2.1.3	ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ EA.HY926.....	- 164 -
5.2.1.4	ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ MKN45.....	- 165 -
5.2.1.5	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	- 166 -
5.2.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΧΤΤ ... - 166 -	- 166 -
5.2.3	ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	- 168 -
5.2.4	ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	- 169 -
5.2.5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ BRADFORD.....	- 170 -
5.2.6	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ (TBARS).....	- 171 -
5.2.7	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΣΩ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ - 172 -	- 172 -
5.2.8	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ.....	- 173 -
5.2.9	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ REAL TIME PCR	- 174 -
5.2.9.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA	- 174 -
5.2.9.2	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	- 175 -

5.2.10	ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ (WESTERN BLOT)	- 177 -
5.2.11	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	- 178 -
5.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 179 -
5.3.1	ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	- 179 -
5.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 186 -
6	4 ^ο ΕΠΙΠΕΔΟ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ. <i>IN VIVO</i> ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟΥ ΟΙΝΟΥ.	- 195 -
6.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	- 195 -
6.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 197 -
6.2.1	ΔΟΣΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	- 197 -
6.2.2	ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΖΩΟΥ	- 197 -
6.2.3	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΖΩΩΝ ΠΟΥ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΟΥΝ – ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΒΑΣΕΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	- 198 -
6.2.4	ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΖΩΩΝ ΑΝΤΙ ΑΛΛΗΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΔΕΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙ ΖΩΑ	- 200 -
6.2.5	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ.....	- 201 -
6.2.6	ΕΚΤΡΟΦΗ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΝΕΚΡΟΤΟΜΗ.....	- 201 -
6.2.7	ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ.....	- 202 -
6.2.8	ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΟΥΣΙΑΣ ΣΤΑ ΖΩΑ.....	- 202 -
6.2.9	ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΖΩΩΝ	- 202 -
6.2.10	ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	- 204 -
6.2.11	ΝΕΚΡΟΤΟΜΗ	- 204 -
6.2.12	ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ.....	- 205 -
6.2.13	ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.	- 206 -
6.2.14	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ (HEMOGLOBIN – Hb) ΣΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ -	- 206 -
6.2.15	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ BRADFORD.....	- 207 -
6.2.16	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH).....	- 208 -
6.2.17	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ (CAT, ΡΥΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ H ₂ O ₂).....	- 211 -
6.2.18	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (TAC)	- 213 -
6.2.19	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS)	- 216 -
6.2.20	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ	- 218 -
6.2.21	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗΣ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗΣ (SOD).....	- 221 -
6.2.22	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GPx) -	- 224 -
6.2.23	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GR)	- 226 -
6.2.24	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ.....	- 229 -
6.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	230
6.3.1	ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	230
6.3.2	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ	230
6.3.3	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ	231
6.3.4	ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	231
6.3.5	ΝΕΚΡΟΤΟΜΗ	233
6.3.6	ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ.....	233
6.3.7	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ.....	237

6.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	241
7	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	247
8	ΚΑΤΑΚΛΕΙΔΑ.....	263
9	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	264
10	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	328
10.1	ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΡΟΜΗΘΕΙΑΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ.....	328
10.2	ΓΝΩΜΑΤΕΥΣΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ	329
10.3	ΆΔΕΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ	330
10.4	ΔΕΛΤΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ.....	332
10.5	ΔΕΛΤΙΟ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ.....	333
10.6	ΔΕΛΤΙΟ ΝΕΚΡΟΤΟΜΗΣ	334
10.7	ΔΕΛΤΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ.....	- 337 -
10.8	1 ^η ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ – ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΜΠΙΣΚΟΤΟ ΑΠΟ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΙΝΟΠΟΙΕΙΩΝ.....	- 341 -
10.9	2 ^η ΠΑΡΑΠΛΕΥΡΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ – ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΠΑΛΑΙΩΜΕΝΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ.....	- 345 -
10.10	ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	- 352 -

Κατάλογος Εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΟ ΒΑΖΟ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΟΙΝΟΥ ΠΟΥ ΧΡΟΝΟΛΟΓΕΙΤΑΙ ΜΕΤΑΞΥ 5.400 – 5.000 Π.Χ. ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΙΡΑΝ ΜΕ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ ΣΤΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΤΟΥ (WINE JAR - 69-12-15 COLLECTIONS - PENN MUSEUM, N.D.).	- 29 -
ΕΙΚΟΝΑ 2: ΑΤΤΙΚΟΣ ΜΕΛΑΝΟΜΟΡΦΟΣ ΑΜΦΟΡΕΑΣ. ΔΥΟ ΣΑΤΥΡΟΙ ΠΛΑΙΣΙΩΝΟΥΝ ΜΕ ΚΙΣΣΟ ΤΟΝ ΔΙΟΝΥΣΟ, ΤΟΝ ΘΕΟ ΤΟΥ ΘΕΑΤΡΟΥ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΚΡΑΤΑ ΕΝΑΝ ΚΑΝΘΑΡΟ, ΤΟ ΤΥΠΙΚΟ ΔΙΟΝΥΣΙΑΚΟ ΑΓΓΕΙΟ ΟΙΝΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΟΠΟΙΟ ΦΥΤΡΩΝΟΥΝ ΚΛΑΔΙΑ ΚΙΣΣΟΥ. 540–530 Π.Χ (FORTHCOMING EXHIBITION ON ANCIENT THEATER AT THE MUSEUM OF CYCLADIC ART - GREECE IS, N.D.).	- 32 -
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ.	- 35 -
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΛΕΥΚΟΥ ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΟΥ ΟΙΝΟΥ (HOW RED WINE IS MADE WINE ENTHUSIAST, N.D.; HOW WHITE WINE IS MADE WINE ENTHUSIAST MAGAZINE, N.D.).	- 36 -
ΕΙΚΟΝΑ 5: ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟΥ(ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ - WINES OF GREECE, N.D.).	- 43 -
ΕΙΚΟΝΑ 6: ΣΤΑΦΥΛΑ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟΥ(ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ - WINES OF GREECE, N.D.).	- 44 -
ΕΙΚΟΝΑ 7: ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΣΥΡΤΙΚΟΥ(ΑΣΥΡΤΙΚΟ - WINES OF GREECE, N.D.).	- 45 -
ΕΙΚΟΝΑ 8: ΣΤΑΦΥΛΙΑ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ(ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ - WINES OF GREECE, N.D.).	- 46 -
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΑΡΙΣΤΕΡΑ ΤΟ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΣΗΜΑ ΓΙΑ ΤΑ ΠΟΠ, ΔΕΞΙΑ ΤΟ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΣΗΜΑ ΓΙΑ ΤΑ ΠΓΕ (EAMBROSIA, N.D.; GEOGRAPHICAL INDICATIONS AND QUALITY SCHEMES EXPLAINED, N.D.; ΟΙΝΟΙ ΠΟΠ-ΠΓΕ, N.D.).	- 47 -
ΕΙΚΟΝΑ 10: ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΡΑΓΑΣ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ: 1. ΚΟΥΚΟΥΤΣΙ 2. ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ [2Α. ΕΞΩΚΑΡΠΙΟ 2Β. ΜΕΣΟΚΑΡΠΙΟ 2C. ΕΝΔΟΚΑΡΠΙΟ] 3. 4. ΑΓΓΕΙΩΔΕΙΣ ΔΕΣΜΙΔΕΣ 5. ΦΛΟΙΟΣ (FILE: WINE GRAPE DIAGRAM EN.SVG - WIKIMEDIA COMMONS, N.D.).	- 49 -
ΕΙΚΟΝΑ 11: ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΟΙΝΟΥ.	- 51 -
ΕΙΚΟΝΑ 12: ΟΙ 20 ΧΩΡΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ(FAOSTAT, N.D.-B).	- 53 -
ΕΙΚΟΝΑ 13: ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΟΥ ΚΑΤΑ ΤΑ ΕΤΗ 2000 ΕΩΣ 2022 ΣΕ ΜΗΛ. (WORLD WINE PRODUCTION OUTLOOK OIV FIRST ESTIMATES).	- 54 -
ΕΙΚΟΝΑ 14: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΟΥ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΈΝΩΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΕΤΗ 2001 ΕΩΣ 2022 ΣΕ ΜΗΛ. (WORLD WINE PRODUCTION OUTLOOK OIV FIRST ESTIMATES).	- 55 -
ΕΙΚΟΝΑ 15: ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΜΗ ΑΜΠΕΛΩΝΩΝ(STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).	- 55 -
ΕΙΚΟΝΑ 16: ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΟΙΝΟΥ ΠΕΡΙΟΔΟΥ 2000 - 2021 ΣΕ ΜΗΛ(STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).	- 56 -
ΕΙΚΟΝΑ 17: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ ΟΙΝΟΥ ΚΑΤ' ΟΓΚΟ (ΜΗΛ)(STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).	- 57 -
ΕΙΚΟΝΑ 18: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΕΜΠΟΡΙΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΑΞΙΑ ΣΥΝΑΛΛΑΓΩΝ (BN EURO)(STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).	- 58 -
ΕΙΚΟΝΑ 19: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΟΜΟΛΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΤΕΡΟΛΥΤΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΕΝΟΣ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΧΗΜΙΚΗ ΕΝΩΣΗ A-B.	- 61 -
ΕΙΚΟΝΑ 20. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ.	- 61 -
ΕΙΚΟΝΑ 21. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	- 63 -
ΕΙΚΟΝΑ 22. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	- 64 -
ΕΙΚΟΝΑ 23. ΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΑΖΩΤΟΥ.	- 64 -
ΕΙΚΟΝΑ 24. ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΘΕΙΟΥ ΚΑΙ ΧΛΩΡΙΟΥ.	- 65 -
ΕΙΚΟΝΑ 25. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ.	- 67 -
ΕΙΚΟΝΑ 26. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS.	- 69 -
ΕΙΚΟΝΑ 27. ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	- 70 -
ΕΙΚΟΝΑ 28.: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ROS ΣΕ ΒΙΟΜΟΡΙΑ (DNA, ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ, ΛΙΠΙΔΙΑ).	- 71 -
ΕΙΚΟΝΑ 29. ΚΥΡΙΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ, (i) ΜΕΣΩ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΜΕΤΑΛΛΟ ΣΤΙΣ ΠΛΕΥΡΙΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΕΣ LYS, PRO, ARG ΚΑΙ THR, (ii) ΜΕ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΕ TRP, (iii) ΩΣ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΠΡΟΗΓΜΕΝΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΓΛΥΚΟΖΥΛΙΩΣΗΣ (AGEs) ΣΕ LYS ΚΑΙ ARG. ΚΑΙ (iv) ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ CYS, HIS ΚΑΙ LYS (FEDOROVA, BOLLINENI AND HOFFMANN, 2014).	- 73 -
ΕΙΚΟΝΑ 30. ΑΛΥΣΙΔΩΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ.	- 74 -
ΕΙΚΟΝΑ 31. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.	- 76 -
ΕΙΚΟΝΑ 32. ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ.	- 77 -
ΕΙΚΟΝΑ 33: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.	- 78 -
ΕΙΚΟΝΑ 34: ΣΥΝΟΨΗ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ.	- 80 -
ΕΙΚΟΝΑ 35: ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΥΚΛΟΥ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ.	- 81 -

ΕΙΚΟΝΑ 36: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΥΦΙΣΤΑΤΑΙ ΣΕ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΝΙΣΟΡΡΟΠΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ. -	87
ΕΙΚΟΝΑ 37: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΕΠΑΓΟΜΕΝΕΣ ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.	88 -
ΕΙΚΟΝΑ 38: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ.	89 -
ΕΙΚΟΝΑ 39: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΚΑΙ ΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	91 -
ΕΙΚΟΝΑ 40: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ Nrf2 ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΪΝΗΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΟΥ Keap1.	92 -
ΕΙΚΟΝΑ 41: ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ Nrf2.....	96 -
ΕΙΚΟΝΑ 42: Η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ.....	99 -
ΕΙΚΟΝΑ 43: ΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ 1 ^{ΟΥ} ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ.	101 -
ΕΙΚΟΝΑ 44: ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN- CIOCALTEU (BIBI SADEER ET AL., 2020).....	102 -
ΕΙΚΟΝΑ 45: ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH• ΣΕ DPPH-H ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ.(BECKER ET AL., 2019).....	104 -
ΕΙΚΟΝΑ 46: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΤΟΥ ABTS• ⁺ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ H ₂ O ₂ . (JOHANNES ET AL., 2006)	105 -
ΕΙΚΟΝΑ 47: ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ABTS• ⁺ ΣΕ ABTS ΚΑΙ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ.(BOLIGON, 2014).....	106 -
ΕΙΚΟΝΑ 48: ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΑΛΛΑΓΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.(BIBI SADEER ET AL., 2020)	107 -
ΕΙΚΟΝΑ 49.Η ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΟΥ NBT ΣΕ ΦΟΡΜΑΖΑΝΗ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ PMS-NADH.(SANTOS & SILVA, 2020)	109 -
ΕΙΚΟΝΑ 50. ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ CUPRAC ΠΑΡΟΥΣΙΑ N _C , ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ (MUNTEANU & ARETREI, 2021)	113 -
ΕΙΚΟΝΑ 51: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,01), **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001). ..	115 -
ΕΙΚΟΝΑ 52: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001). ..	116 -
ΕΙΚΟΝΑ 53: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. * ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,05), ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,01), *** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,001), **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001).....	117 -
ΕΙΚΟΝΑ 54: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001).....	118 -
ΕΙΚΟΝΑ 55: ΙΣΧΥΡΗ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ IC50 (-0,7961 p<0,0001)	118 -
ΕΙΚΟΝΑ 56: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. * ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,05), ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΥΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,01), *** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,001).	119 -
ΕΙΚΟΝΑ 57: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,01).....	120 -
ΕΙΚΟΝΑ 58: ΙΣΧΥΡΗ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ IC50 (-0,5152 p<0,01).	120 -
ΕΙΚΟΝΑ 59: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. * ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,05), ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,01), *** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,001), **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001).	121 -
ΕΙΚΟΝΑ 60: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001).....	122 -
ΕΙΚΟΝΑ 61: ΙΣΧΥΡΗ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ AU0.5 (-0,8846 p<0,0001).	122 -
ΕΙΚΟΝΑ 62: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. * ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,05), ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,01), *** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,001), **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001).	123 -
ΕΙΚΟΝΑ 63: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± SEM. ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (p < 0,0001).....	124 -
ΕΙΚΟΝΑ 64: ΙΣΧΥΡΗ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ IC50 (-0,8728 p<0,0001).	124 -

ΕΙΚΟΝΑ 65: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ $\pm$ SEM. * ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,05$), ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,01$), *** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,001$), **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,0001$).	- 125 -
ΕΙΚΟΝΑ 66: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ $\pm$ SEM. ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,0001$).	- 126 -
ΕΙΚΟΝΑ 67: ΙΣΧΥΡΗ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ IC50 (-0,7559 $p < 0,0001$).	- 126 -
ΕΙΚΟΝΑ 68: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ $\pm$ SEM, **** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,0001$).	- 127 -
ΕΙΚΟΝΑ 69: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ ΚΑΙ ΛΕΥΚΩΝ ΟΙΝΩΝ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ $\pm$ SEM. ** ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,0001$).	- 128 -
ΕΙΚΟΝΑ 70: ΙΣΧΥΡΗ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ AU0.5 (-0,8443 $p < 0,0001$).	- 128 -
ΕΙΚΟΝΑ 71: ΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ 2 ^{oy} ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ.	- 136 -
ΕΙΚΟΝΑ 72.ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΗΣ 2-ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΖΗΣ ΣΕ MDA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ OH•. (TREML & ŠMEJKAL, 2016).	- 139 -
ΕΙΚΟΝΑ 73: ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΤΒΟΟΗ.	- 142 -
ΕΙΚΟΝΑ 74: ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ.	- 143 -
ΕΙΚΟΝΑ 75: ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΠΟΥ ΔΗΛΩΝΟΥΝ ΟΤΙ Η ΣΥΓΚΕΝΩΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΤΟΞΙΚΗ ΓΙΑ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.	- 144 -
ΕΙΚΟΝΑ 76: ΠΡΟΦΙΛ LC-ESI(-)-HRMS ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ: (Α) ΑΣΥΡΤΙΚΟ, (Β) ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ, (C) ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ ΚΑΙ (D) ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ.	- 149 -
ΕΙΚΟΝΑ 77: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ (Α) ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΙΚΩΝ, (Β) ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ (Γ) ΓΛΥΚΟΖΙΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΟΛΑ ΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ.	- 150 -
ΕΙΚΟΝΑ 78: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΕ IN VITRO ΔΟΚΙΜΕΣ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ $\pm$ SD. A-D: ΟΙ ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ ΧΩΡΙΣ ΚΟΙΝΟ ΓΡΑΜΜΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΥΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ($p < 0,05$).	- 152 -
ΕΙΚΟΝΑ 79: ΠΙΘΑΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.	- 155 -
ΕΙΚΟΝΑ 80: ΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ 3 ^{oy} ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ.	- 162 -
ΕΙΚΟΝΑ 81: ΚΥΤΤΑΡΑ HEPG2(HEP G2 [HEPG2] - HB-8065 ATCC).	- 163 -
ΕΙΚΟΝΑ 82: ΚΥΤΤΑΡΑ EA.HY926(EA.HY926 - CRL-2922 ATCC, N.D.).	- 164 -
ΕΙΚΟΝΑ 83: ΚΥΤΤΑΡΑ MKN45(CELL SEARCH SYSTEM -CELL BANK- (RIKEN BRC) [RCB1001 : MKN45], N.D.). ..	- 165 -
ΕΙΚΟΝΑ 84: ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΟΥ ΧΤΤ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΗ ΦΟΡΜΑΖΑΝΗ (ΚΟΥΚΑ, 2020).	- 167 -
ΕΙΚΟΝΑ 85: ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΟΣ ΠΛΑΚΑ NEUBAUER.	- 167 -
ΕΙΚΟΝΑ 86: ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ.	- 171 -
ΕΙΚΟΝΑ 87: ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ (Α), ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ (Β), ΑΣΥΡΤΙΚΟ (Γ) ΚΑΙ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ (Δ) ΣΤΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HEPG2. *ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ($p < 0,05$). ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΕΙΣ ΤΡΙΠΛΟΥΝ ΚΑΙ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΑΝΕΞΕΑΡΤΗΤΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ $\pm$ SEM.	- 181 -
ΕΙΚΟΝΑ 88: ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ (Α), ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ (Β), ΑΣΥΡΤΙΚΟ (Γ) ΚΑΙ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ (Δ) ΣΤΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ EA.HY926. *ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ($p < 0,05$) ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΕΙΣ ΤΡΙΠΛΟΥΝ ΚΑΙ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΑΝΕΞΕΑΡΤΗΤΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ $\pm$ SEM.	- 182 -
ΕΙΚΟΝΑ 89: ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ (Α), ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ (Β), ΑΣΥΡΤΙΚΟ (Γ) ΚΑΙ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ (Δ) ΣΤΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ MKN45. *ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ($p < 0,05$). ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΕΙΣ ΤΡΙΠΛΟΥΝ ΚΑΙ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΑΝΕΞΕΑΡΤΗΤΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ $\pm$ SEM.	- 183 -
ΕΙΚΟΝΑ 90: ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ (Α), ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ (Β), ΑΣΥΡΤΙΚΟ (Γ) ΚΑΙ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ (Δ) ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ NFE2L2, GCLC ΚΑΙ ACLY ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ HEPG2, EA.HY926 ΚΑΙ MKN45. *ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ($p < 0,05$). ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΕΙΣ ΤΡΙΠΛΟΥΝ ΚΑΙ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΑΝΕΞΕΑΡΤΗΤΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ. Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΕΧΕΙ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΘΕΙ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ GARDH ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΜΕ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ. ΌΛΑ ΤΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΟΣΗ 50 MG/ML. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ $\pm$ SEM.	- 184 -
ΕΙΚΟΝΑ 91: ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ (Α), ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ (Β), ΑΣΥΡΤΙΚΟ (Γ) ΚΑΙ ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ (Δ) ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ GCLC ΚΑΙ ACLY ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ HEPG2, EA.HY926 ΚΑΙ MKN45. *ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ	

ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ($p < 0,05$). ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΕΙΣ ΤΡΙΠΛΟΥΝ ΚΑΙ ΣΕ ΤΕΣΣΕΡΙΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ. ΌΛΑ ΤΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΔΟΣΗ 50 MG/ML. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΩΣ ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ $\pm$ SEM.....	- 185 -
ΕΙΚΟΝΑ 92: ΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ 4 ^{ΟΥ} ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ. ΕΔΩ ΑΝΑΦΕΡΕΙΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΝΩ ΕΙΣΑΙ ΣΤΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ. ΔΕΝ ΕΙΝΑΙ ΣΩΣΤΟ.....	- 196 -
ΕΙΚΟΝΑ 93: G*POWER OUTPUT.....	- 199 -
ΕΙΚΟΝΑ 94: G*POWER OUTPUT, T-TEST.....	- 200 -
ΕΙΚΟΝΑ 95. ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ, ΓΡΑΜΜΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΑΠΟ 05 ΕΩΣ 1,5 MG/ML.....	- 208 -
ΕΙΚΟΝΑ 96: ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ ΕΠΙΜΥΟΣ. ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ.....	236
ΕΙΚΟΝΑ 97: ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ ΕΠΙΜΥΟΣ. ΟΜΑΔΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ.....	236
ΕΙΚΟΝΑ 98: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ GSH ΚΑΙ TAC ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ. * $p < 0.05$	237
ΕΙΚΟΝΑ 99: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ TBARS ΚΑΙ CARBS ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ. * $p < 0.05$	238
ΕΙΚΟΝΑ 100: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΟΙΝΟΥ ΣΤΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΚΑΙ ΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SOD ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ. * $p < 0.05$	239
ΕΙΚΟΝΑ 101: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΟΙΝΟΥ ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ GPX ΚΑΙ ΤΗΣ GR ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ. * $p < 0.05$	240
ΕΙΚΟΝΑ 102: ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΒΙΟΛΕΤΟΥΡΓΙΚΟΥ ΤΡΟΦΙΜΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ GSH, TAC ΚΑΙ TBARS ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΤΩΝ ΜΥΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ. * $p < 0.05$	- 342 -
ΕΙΚΟΝΑ 103: ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΟΙΝΟΥ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΜΑΥΡΟΔΑΦΝΗΣ ΔΙΑΤΗΡΗΜΕΝΟ ΓΙΑ 130 ΧΡΟΝΙΑ ΣΕ ΒΑΡΕΛΙ.....	- 346 -
ΕΙΚΟΝΑ 104: ΟΛΙΚΟ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ. ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΙ ΣΑΝ MG ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΝΑ ML ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	- 347 -
ΕΙΚΟΝΑ 105: ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΡΙΖΩΝ DPPH•, ABTS•+, O2•- ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ. A-C: ΜΠΑΡΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ.....	- 347 -
ΕΙΚΟΝΑ 106: ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΧΑΛΚΟΥ ΤΩΝ ΤΕΣΣΑΡΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ. A-C: ΜΠΑΡΕΣ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΓΡΑΜΜΑ, ΔΙΑΦΕΡΟΥΝ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ.	- 348 -

Κατάλογος Πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	- 26 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΠΟΠ ΚΑΙ ΠΓΕ ΣΤΙΣ 4 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ (ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ - WINES OF GREECE, N.D.; ΑΣΥΡΤΙΚΟ - WINES OF GREECE, N.D.; ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ - WINES OF GREECE, N.D.; ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ - WINES OF GREECE, N.D.).	- 48 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ.....	- 103 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 4.ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ DPPH.-	104 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 5.ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ABTS.-	106 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 6.ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER.	- 108 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 7.ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΡΙΖΑ O ² ·.	- 110 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 8.ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΟΥ DNA.	- 112 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ CUPRAC ASSAY.	- 113 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ DPPH.	- 117 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 11: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ABTS.	- 119 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 12: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ REDUCING POWER.	- 121 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 13: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ SUPEROXIDE RADICAL SCAVENGING.	- 123 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 14: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ PLASMID DNA RELAXATION ASSAY.-	125 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 15: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΑΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ CUPRAC.	- 127 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 16: ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΘΕ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΠΟΥ ΠΕΡΝΑΕΙ ΣΤΟ 2 ^ο ΕΠΙΠΕΔΟ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ.....	- 134 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 17.ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.....	- 139 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 18: ΒΑΡΗ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	- 146 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 19: ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	- 147 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 20: ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΟΥ PEAK AREA ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ.....	- 148 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 21: ΟΛΙΚΟ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ (TPC) ΤΩΝ 4 ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΟΥ.....	- 150 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 22: ΑΝΤΙΓΟΝΙΔΙΟΤΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΧΑΛΑΡΩΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ.	- 153 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 23: ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΟΓΟΝΟΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ AMES.....	- 153 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 24: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ HERG2.....	- 164 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 25: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ EA.HY926.....	- 165 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 26: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ MKN45.....	- 165 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 27: ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.	- 173 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 28: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ.....	- 176 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 29: ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟ ΟΡΙΟ (MG/ML) ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΟΙΝΟΥ ΣΤΙΣ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.	- 179 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 30: ΝΟΥΜΕΡΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΙΛΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΟ G*POWER. ΣΩΣΤΑ, ΤΟ ΕΙΧΑ ΓΡΑΨΕΙ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΩΣ ΣΧΟΛΙΟ ΑΛΛΑ ΤΟ ΕΣΒΗΣΑ.	- 199 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 31: ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	- 207 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 32: ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ Η ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ. -	208
ΠΙΝΑΚΑΣ 33: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΑΙΜΑ.	- 209 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 34. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ.	- 210 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 35: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ ΣΕ ΑΙΜΑ.....	- 211 -

ΠΙΝΑΚΑΣ 36. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ.	- 212 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 37: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΤΑC ΣΤΟ ΑΙΜΑ.- 214 -	
ΠΙΝΑΚΑΣ 38 : ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΤΑC ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.	- 215 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 39: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΤΒΑRS ΣΤΟ ΑΙΜΑ.	- 216 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 40. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΤΒΑRS ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.	- 217 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 41: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ CARBS ΣΤΟ ΑΙΜΑ.	- 219 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 42. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ CARBS ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.	- 220 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 43: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ SOD ΣΤΟ ΑΙΜΑ.	- 222 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 44: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ SOD ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ.	- 223 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 45: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GRX ΣΤΟ ΑΙΜΑ.	- 224 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 46: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GRX ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.	- 225 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 47: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GR ΣΤΟ ΑΙΜΑ.	- 227 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 48: ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ GR ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.	- 228 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 49: ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ Ο ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.	231
ΠΙΝΑΚΑΣ 50: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ.	232
ΠΙΝΑΚΑΣ 51: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ.	233
ΠΙΝΑΚΑΣ 52: ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ (ΠΝΕΥΜΟΝΑΣ), ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΔΕΛΤΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ.	234
ΠΙΝΑΚΑΣ 53: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ.	235
ΠΙΝΑΚΑΣ 54: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΕΝΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ.	235

Πρόλογος

Η διδακτορική διατριβή που αναλύεται στο παρόν σύγγραμμα ξεκίνησε το Μάρτιο του 2020, ολοκληρώθηκε το Μάρτιο του 2023 και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επιβλέπων Καθηγητής της διατριβής ήταν ο κ. Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας, Διευθυντής του ομώνυμου Εργαστηρίου. Η χρηματοδότηση της διατριβής προήλθε από 3 πηγές. Αρχικά από την εμβληματική δράση «Οι Δρόμοι των Αμπελώνων» της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας. Επιπλέον χρηματοδότηση προήλθε από ιδίους πόρους του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και τέλος από τον Τεχνοβλαστό του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας FoodOxys.

Γενικά στοιχεία και σκοπός της μελέτης:

Σύμφωνα με τα στοιχεία του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV) η κατανάλωση οίνου το 2021 στον πλανήτη ανήλθε σε 23.600.000.000 λίτρα. Η κατανάλωση αυτή αντιστοιχεί σε μία αγορά 435 δισεκατομμυρίων δολαρίων για την ίδια χρονιά. Επιπλέον, η εκτίμηση για την αντίστοιχη αγορά το 2028 εκτιμάται σε 686.000.000.000 δολάρια.

Ο οίνος είναι ένα προϊόν που μελετάται συστηματικά από ερευνητές από όλο τον κόσμο και έχει δημιουργήσει προϊόντα με πολύ μεγάλη προστιθέμενη αξία, όπως οι γαλλικοί οίνοι και η επίδρασή τους στο «Γαλλικό Παράδοξο». Ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε ερευνητικά εργαστήρια, όπως η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη κ.α. έχουν αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σημαντικά στην αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη και νευροπροστατευτική δράση.

Η Ελλάδα με το ιδιαίτερο κλίμα της, που περιλαμβάνει από χαμηλές θερμοκρασίες στα βόρεια, μέχρι μεγάλες περιόδους ανυδρίας και υψηλών θερμοκρασιών αλλά και πολύ έντονων περιόδων ανέμου σε συνδυασμό με το ιδιαίτερο ανάγλυφό της, δημιουργεί πρόσφορο έδαφος για την παραγωγή εξαιρετικής ποιότητας οίνων.

Η θεωρητική αυτή προσέγγιση πρέπει να αποδειχθεί επιστημονικά ώστε οι ελληνικοί οίνοι να μπορέσουν να αποκτήσουν την προστιθέμενη αξία που τους

αναλογεί. Κάτι τέτοιο θα βοηθούσε σημαντικά τις ελληνικές εταιρείες, αλλά και το ίδιο το κράτος, καθώς θα αυξάνονταν τα έσοδα της χώρας από τις εξαγωγές.

Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η βιοδραστικότητα οίνων και εκχυλισμάτων τεσσάρων γηγενών ποικιλιών αμπέλου, των ερυθρών ποικιλιών Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο, καθώς και των λευκών ποικιλιών Ασύρτικο και Μαλαγουζιά.. Προς αυτή την κατεύθυνση αξιολογήθηκε αρχικά η αντιοξειδωτική τους ικανότητα σε *in vitro* συστήματα. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η επίδρασή τους στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό φυσιολογικών αλλά και καρκινικών κυτταρικών σειρών, με πλήθος πρωτοκόλλων για τον προσδιορισμό της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και της έκφρασης κρίσιμων γονιδίων. Τέλος, το πιο βιοδραστικό εκχύλισμα οίνου, χορηγήθηκε σε επίμυες, σε δόση αντίστοιχη με την κατανάλωση δύο ποτηριών από τον άνθρωπο, με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση του σε διάφορους ιστούς και όργανα.

λα τα παραπάνω, με τη δημοσίευσή τους σε διεθνή έγκυρα περιοδικά με κριτές, αλλά και της ενημέρωσης των Ελληνικών οινοποιείων και εμπόρων, θα συνεισφέρουν στην προσπάθεια ανάδειξης των Ελληνικών τοπικών οίνων, αξιολογημένων πλέον για τη βιοδραστικότητά τους.

Ερωτήματα μελέτης:

- Παρουσιάζουν οι Ελληνικοί οίνοι βιοδραστικότητα;
- Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των Ελληνικών ποικιλιών οίνου ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα και το πολυφαινολικό περιεχόμενο;
- Τί επίδραση έχουν τα εκχυλίσματα των Ελληνικών οίνων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση σε επίπεδο κυττάρων;
- Η ισχυρή βιοδραστικότητα που παρουσιάζουν οι Ελληνικοί οίνοι και τα εκχυλίσματα τους *in vitro*, εμφανίζονται και σε *in vivo* επίπεδο;
- Μπορούν οι Ελληνικοί οίνοι να ανταγωνιστούν διεθνείς οίνους;

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής:

1. Tekos, F., Makri, S., Skaperda, Z. V., Patouna, A., Terizi, K., Kyriazis, I. D., Kotseridis, Y., Mikropoulou, E. V., Papaefstathiou, G., Halabalaki, M., & Demetrios, K. (2021). Assessment of Antioxidant and Antimutagenic Properties

of Red and White Wine Extracts In Vitro. *Metabolites*, 11(7), 436.
<https://doi.org/10.3390/metabo11070436>

2. Tekos F, Skaperda Z, Vardakas P, Kyriazi D, Maravelis GC, Poulas K, Taitzoglou IA, Nepka C, Kouretas D. Redox Biomarkers Assessment after Oral Administration of Wine Extract and Grape Stem Extract in Rats and Mice. *Molecules*. 2023; 28(4):1574.
<https://doi.org/10.3390/molecules28041574>

Συντομογραφίες

Πίνακας 1: Συντομογραφίες

ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
RNS	Reactive Nitrogen Species	Δραστικές μορφές αζώτου
RSS	Reactive Sulfur species	Δραστικές μορφές θείου
RCS	Reactive Chlorine species	Δραστικές μορφές χλωρίου
O₂^{•-}	Superoxide radical	Ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου
HO[•]	Hydroxyl radical	Ρίζα υδροξυλίου
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
NO	Nitric oxide	Μονοξείδιο του αζώτου
SOD	Superoxide dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT	Catalase	Καταλάση
GSH	Reduced glutathione	Ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	Oxidized glutathione	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
DPPH[•]	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid	2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
ARE	Antioxidant Response Elements	Στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης
GST	Glutathione S-Transferase	S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης

UGT	UDP-glucuronosyltransferase	UDP γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση
NGO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1	NAD(P)H αφυδρογονάση της κινόνης
MDR	Multidrug Resistance-Associated Proteins	Πρωτεΐνες που ευθύνονται για την αντίσταση σε πολλαπλά φάρμακα
BCRP	Breast Cancer Resistant Protein	Πρωτεΐνη αντίστασης στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού
GPx	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Glutathione reductase	Αναγωγάση της γλουταθειόνης
ACLY	ATP-Citrate Lyase	ATP-κιτρικής λυάσης
FAT	Fatty Acid Synthase	Συνθάση λιπαρών οξέων
SCD-1	stearoyl CoA desaturase	Στεαροϋλο-CoA δεσατουράσης-1
HRP	Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση του χρένου
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
RBCL	Red blood cell lyate	Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα
TAC	Total antioxidant capacity	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBARS	Thiobarbituric Reactive Substances	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
TBA	Thiobarbituric acid	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
MDA	Malondialdehyde	Μηλονική διαλδεΰδη
CARB	Protein carbonyls	Πρωτεϊνικά καρβονύλια
TCA	Trichloroacetic acid	Τριχλωροοξικό οξύ

DNP	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
PBS	Phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
Hb	Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	Διθειο-δυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	1-χλωρο, 2,4-δινιτροβενζόλιο

1. Εισαγωγή

1.1 Οίνος

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο οίνος έχει μεγάλη ιστορία, η οποία ξεκινάει πριν από 7.000 χρόνια. Τα πρώτα υπολείμματα οίνου έφερε στο φως η αρχαιολογική σκαπάνη στο βουνό Ζάργος του Ιράν, τα οποία χρονολογούνται περίπου στο 5.500 π.Χ. (McGovern et al., 1996). Στα υπολείμματα που ανιχνεύθηκαν, βρέθηκαν ίχνη τρυγικού οξέος, ενώ είναι σε εξέλιξη δοκιμές για την ανίχνευση ταννινών.



Εικόνα 1: Ανακατασκευασμένο θάζο αποθήκευσης οίνου που χρονολογείται μεταξύ 5.400 – 5.000 π.Χ. που βρέθηκε στην περιοχή του Ιράν με υπολείμματα οίνου στο εσωτερικό του (Wine Jar - 69-12-15 | Collections - Penn Museum, n.d.).

Η συστηματική αμπελουργία και οινοποίηση είναι μια ενασχόληση του ανθρώπου η οποία φαίνεται να ξεκίνησε στην περιοχή νότια του Καυκάσου και από εκεί πέρασε με την πάροδο των ετών σε γειτονικές χώρες, όπως την Αίγυπτο, τη Μεσοποταμία, το Ιράκ, το Ιράν, τη Συρία, την Ελλάδα και τέλος στους υπόλοιπους πληθυσμούς της Μεσογείου. (Soleas et al., 1997; ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΓΝΩΣΙΑ (ΔΙΤΟΜΟ) / ΣΟΥΦΛΕΡΟΣ ΗΡ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ).

Οι Ρωμαίοι, αφιέρωναν τον οίνο στο Βάκχο, ενώ οι αρχαίοι Έλληνες τόσο το σταφύλι όσο και τον παραγόμενο οίνο στο θεό Διόνυσο. Υπάρχουν πολλές αναπαραστάσεις από τρύγο, αμπέλια, σταφύλια, οίνο πάνω σε αγγεία της εποχής, γλυπτά, νομίσματα και ψηφιδωτά. Τα ευρήματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά και δείχνουν την μεγάλη παράδοση που είχε ο άνθρωπος με το αμπέλι και τον οίνο ανά τους αιώνες (Bertelli & Das, 2009). Επιπλέον, οι ανασκαφές στον τάφο του Τουταγχαμών στην Αίγυπτο φέρνουν στο φως αμφορείς που φυλάσσονταν λευκός και ερυθρός οίνος το 1.300 π.Χ., ενώ εικόνες χαραγμένες σε πέτρες τις περιοχής δείχνουν τη διαδικασία παραγωγής οίνου και χρονολογούνται από το 3.000 π.Χ., επισφραγίζοντας το γεγονός της συστηματικής οινοποίησης στην περιοχή. (Chambers & Pretorius, 2010; McGovern et al., 1996).

Το πώς πραγματοποιήθηκε η πρώτη οινοποίηση θεωρείται ακόμη γνωστό και πιθανώς βρίσκεται στη λήθη των αιώνων, ωστόσο οι περισσότεροι ιστορικοί αλλά και επιστήμονες καταλήγουν πως μάλλον πρόκειται για τυχαίο γεγονός. Ως γνωστόν, η αλκοολική ζύμωση που πραγματοποιείται για την μετατροπή του αμπελόζουμου σε οίνο απαιτεί την παρουσία του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Ο ζυμομύκητας αυτός ωστόσο δεν εντοπίζεται φυσιολογικά στα σταφύλια και στο αμπέλι. Η πιο πιθανή εξήγηση φαίνεται να είναι η μεταφορά του από το φλοιό των βελανιδιών κατά την ταυτόχρονη συγκομιδή και φύλαξη των δυο ειδών (Chambers & Pretorius, 2010; Hyma & Fay, 2013).

Η τέχνη της οινοποίησης έφτασε σε όλα τα μήκη και πλάτη της γης με τα ταξίδια του Κολόμβου τον 15^ο αιώνα και εντάθηκε ακόμα περισσότερο με τα μεταναστευτικά κύματα των Ευρωπαίων του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα στη Βόρεια και Νότια Αμερική, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, όπου και καθιέρωσαν την αμπελοκομία και την παραγωγή οίνου στο «Νέο Κόσμο» (Wine | Definition, History, Varieties, & Facts | Britannica).

Η μετανάστευση του καρπού και των αμπελώνων σε περιοχές με θερμότερο κλίμα και η ελλιπής γνώση των παραδοσιακών τεχνικών της Ιταλίας και Γαλλίας, που στηρίζονταν στην προέλευση και τη δημιουργία τερουάρ, έδωσε τη δυνατότητα για νέες καινοτόμες ιδέες και οινοποίηση σε βιομηχανικές μονάδες. Η εφαρμογή αυτή δημιούργησε οίνους πολύ διαφορετικούς από αυτά της Δύσης, με μεγαλύτερο αλκοολικό βαθμό, ακόμα πιο συμπαγές σώμα με περισσότερο φρουτώδη χαρακτήρα.

Το παραγόμενο προϊόν τοποθετήθηκε σε καλύτερης ποιότητας και αισθητικής μπουκάλια, ακολούθησε καλύτερες και πρωτότυπες ιδέες προώθησης, αυξάνοντας τις πωλήσεις. Αυτές έφεραν ακόμα μεγαλύτερες και σύγχρονες μονάδες παραγωγής, ενώ με τη βοήθεια της επιστήμης, από τον 17^ο αιώνα, με την εκτενή χρήση θείου για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών που προσέβαλαν μέχρι τότε το αμπέλι, έφεραν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οίνων πολύ πιο ποιοτικών, τόσο σε γευστικά χαρακτηριστικά, αλλά και με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και επίπεδα αντιοξειδωτικών. (Gadoury et al., 2012). Τέλος, όλα τα παραπάνω είχαν άμεσο αντίκτυπο στην εμπορική αξία του τελικού προϊόντος, η οποία αυξήθηκε σημαντικά (Banks & Overton, 2010).

Σταθμός στη σύγχρονη ιστορία θα μπορούσε να είναι το 1860. Τη χρονιά αυτή το *Daktulapha vitifoliae*, ένα παράσιτο που υπήρχε σε αμπελοκαλλιέργειες της Αμερικής, όπου λαϊκά ονομάζεται ‘φυλλοξήρα του οίνου’, έφτασε στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στους αμπελώνες της ανατολικής Γαλλίας όπου κατέστρεψε τις καλλιέργειες εκεί και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε όλους τους αμπελώνες της Γηραιάς Ηπείρου με αποτέλεσμα την καταστροφή άνω του 60% της σοδιάς, το οποίο κράτησε μέχρι και τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Αυτό είχε ιδιαίτερα μεγάλο οικονομικό και κοινωνικό αντίκτυπο για πολλούς ανθρώπους, κοινωνίες και χώρες της περιοχής.

Επειδή η φυλλοξήρα έπληττε για πρώτη φορά τις καλλιέργειες στην Ευρώπη, ο γηγενής πληθυσμός των φυτών δεν είχε καμία ανθεκτικότητα στη συγκεκριμένη ασθένεια, ενώ ο αντίστοιχος πληθυσμός της Αμερικής είχε αποκτήσει και ανθεκτικά στελέχη. Για να αντιμετωπιστεί η κατάσταση έγινε εμβολιασμός αμερικανικών υβριδίων με τοπικές ποικιλίες σε μία προσπάθεια να μην υποβαθμιστεί η αξία της τοπικότητας. Το συγκεκριμένο μοντέλο απαντάται ευρέως από τότε μέχρι και σήμερα στους περισσότερους αμπελώνες για την αντιμετώπιση της φυλλοξήρας (Kwon & Constantinides, 2017; Powell et al., 2013; Tello et al., 2019).

Από την τυχαία ανακάλυψη του και μετά, ο οίνος, αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της κουλτούρας του ανθρώπου. Ταξίδεψε με μετανάστες στα πέρατα της γης, συντροφεύει την καθημερινότητά του, και βρίσκεται ψηλά σε κάθε πολιτισμό, λαϊκή παράδοση και θρησκευτικές τελετές των ανθρώπων. Έγινε σύμβολο εορτών, της υγείας, της παρέας. Απαγορεύτηκε και φυσικές καταστροφές το οδήγησαν στο χείλος της εξαφάνισης, ωστόσο άντεξε σε όλα τα παραπάνω και σήμερα είναι αδιαμφισβήτητα μία από τις μεγαλύτερες και πιο εξελισσόμενες αγροτικές επιστήμες.

1.1.2 Οινοποίηση στον Ελλαδικό χώρο

Τα πρώτα ευρήματα που σχετίζονται με την καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα εμφανίζονται σε αρχαιολογικούς τόπους της Μακεδονίας και της Θεσσαλίας από την στερη Νεολιθική εποχή (4300-2800 π.Χ.) χωρίς να είναι βέβαιο ότι γινόταν συστηματική καλλιέργεια. Οι πρώτες ενδείξεις συστηματικής ενασχόλησης με το αμπέλι προέρχονται από ευρήματα 2.000 χρόνια αργότερα, κατά την στερη Ελλαδική περίοδο IV (2200-2000 π.Χ.) (McGovern et al., 1996). Αγγεία που βρέθηκαν στην Κρήτη και χρονολογούνται στην Πρώιμη εποχή του Χαλκού (3200-2000 π.Χ.)



Εικόνα 2: Αττικός μελανόμορφος αμφορέας. Δύο Σάτυροι πλαισιώνουν με κισσό τον Διόνυσο, τον θεό του θεάτρου, ο οποίος κρατά έναν κάνθαρο, το τυπικό διονυσιακό αγγείο οίνου από το οποίο φυτρώνουν κλαδιά κισσού. 540–530 π.Χ (Forthcoming Exhibition on Ancient Theater at the Museum of Cycladic Art - Greece Is, n.d.)

αναλύθηκαν για το περιεχόμενο που έφεραν και τα αποτελέσματα έδειξαν με βεβαιότητα ότι περιείχαν οίνο (Valamoti et al., 2007).

Ελλάδα και Ιταλία κατά την Κλασική περίοδο (480-323 π.Χ.) ήταν οι δύο γνωστότερες χώρες στην αμπελουργία και την παραγωγή οίνου. Στη Βόρεια Ελλάδα και κυρίως στη Θράκη και στα νησιά Θάσο, Χίο και Λήμνο παράγονταν οίνοι που θεωρούνταν οι καλύτεροι στον κόσμο. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι παρόλη την παγκοσμιοποίηση και τις παγιωμένες ποικιλίες της Δύσης και κυρίως της Γαλλίας, η Ελλάδα καλλιεργεί ακόμα γηγενείς και πιθανότατα αρχαίες ποικιλίες (Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία

Google, n.d.-a).

Βοτανολογικά ευρήματα της Νεολιθικής Περιόδου (10.000 – 2.200 π.Χ.) στους Φιλίππους περιέχουν καψαλισμένους πυρήνες σταφυλιών που βρέθηκαν σε οικήματα που χρονολογούνται στο 4460-4000 π.Χ.. Η φωτιά που είχε κάψει τα σπίτια, διατήρησε τους καρπούς στους οποίους εκτός του πυρήνα βρέθηκαν μαζί με την εξωτερική επιφάνεια τους, υποδηλώνοντας ότι είχαν χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή του χυμού τους και την παραγωγή οίνου. Επιπλέον, ευρήματα στην περιοχή, όπως ποτήρια με δύο λαβές, συμπληρώνουν τη θεωρία ότι ήδη την περίοδο εκείνη, ασχολούνταν με την οινοπαραγωγή (Valamoti et al., 2007).

1.1.3 Ο ρόλος του οίνου στην αρχαία Ελλάδα

Οι βασικότερες γνώσεις που διαθέτουμε όσον αφορά την παραγωγική διαδικασία, τις ποσότητες, αλλά και τη διανομή του οίνου στην Αρχαία Ελλάδα είναι από Μινωικά και Μυκηναϊκά διοικητικά έγγραφα, τα οποία είναι γραμμένα σε Γραμμική Α και Γραμμική Β. Τα ανάκτορα συγκέντρωναν όλη την παραγωγή και τη φύλασσαν για διάφορες περιστάσεις. Μεταξύ αυτών ο οίνος προοριζόταν για εμπορία,

για παρασκευή αρωμάτων, για ιεροτελεστίες και κατανάλωση σε εορτές. Γενικά ο οίνος συνοδεύει την παράδοση των Ελλήνων εδώ και 5.000 χρόνια. (McGovern et al., 1996).

Οι επιδράσεις του οίνου στον άνθρωπο ήταν γνωστές στον αρχαίο κόσμο και επισημαίνονταν τόσο οι θετικές όσο και οι αρνητικές συνέπειές του. Εκτεταμένες αναφορές τον 4^ο π.Χ. αιώνα έχουμε από τον Ιπποκράτη ο οποίος συγκέντρωσε όλη την μέχρι τότε γνώση γύρω από τις θεραπευτικές ιδιότητες του οίνου. Ο ίδιος έφτασε στο σημείο να συνταγογραφεί συγκεκριμένες ποικιλίες οίνου για διαφορετικές παθήσεις. Οι θεωρίες αυτές του Ιπποκράτη και των μεταγενέστερών του ακολουθήθηκαν πλήρως και από τους Ρωμαίους, όπως για παράδειγμα από τον Κέλσο (27 π.Χ- 37 μ.Χ.), ο οποίος έδωσε πολύ μεγάλη σημασία στο ρόλο που έχει η διατροφή του ανθρώπου στην πρόληψη και στη θεραπεία ασθενειών. Παρά το γεγονός ότι οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι συστήνουν μέσα από τα κείμενά τους την φαρμακευτική χρήση του οίνου, καθιστούν σαφές αυτή να πραγματοποιείται με φειδώ. Είναι ευρέως γνωστό ότι η κατανάλωση του οίνου γινόταν τότε με αραίωση του με νερό με σκοπό να προλάβουν τα συμπτώματα της μέθης, ενώ μόνο ο θεός Διόνυσος και οι άλλοι θεοί μπορούσαν να το καταναλώσουν σκέτο (McGovern et al., 1996).

1.1.4 Κατηγορίες οίνων

Ο οίνος αποτελεί μια κατηγορία οينوπνευματώδους ποτού που δημιουργείται από την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους των σταφυλιών. Όλοι οι διαθέσιμοι οίνοι που πωλούνται σήμερα εντάσσονται σε κατηγορίες βάσει διάφορων στοιχείων, όπως η γεωγραφική προέλευση, η ποικιλία της αμπέλου, οι τεχνικές οινοποίησης και παλαίωσης.

Μια σημαντική κατηγοριοποίηση έχει να κάνει με τους οίνους Ονομασίας Προέλευσης και τους Επιτραπέζιους οίνους. Οι οίνοι Ονομασίας Προέλευσης καλλιεργούνται από γηγενείς ποικιλίες της περιοχής που φέρει η επωνυμία τους και διαθέτουν οργανοληπτικά στοιχεία που αναπτύσσονται στο μικροοικονομικό σύστημα της περιοχής. Από την άλλη πλευρά, οι επιτραπέζιοι οίνοι κατατάσσονται σε υποκατηγορίες, όπως τους Τοπικούς Οίνους, οι οποίοι έχουν τη γεωγραφική τους καταγωγή ως ένδειξη, αλλά πληρούν ορισμένα μόνο από τα κριτήρια για την παραγωγή τους σε σχέση με τους οίνους Ονομασίας Προέλευσης. Μια άλλη υποκατηγορία είναι οι οίνοι με Ονομασία κατά Παράδοση, οι οποίοι διαφοροποιούνται λόγω της τεχνικής

παραγωγής τους, η οποία βασίζεται στην παράδοση. Τέλος, υπάρχουν και οι οίνοι Μάρκας που διατίθενται με ποικίλες ονομασίες και διαφέρουν από τους υπόλοιπους λόγω ειδικών τεχνικών και γνώσης, αλλά και υψηλών στάνταρ ποιότητας παραγωγής.

Μια ακόμα κατάταξη των οίνων σχετίζεται με το χρώμα. Με βάση αυτό, ο οίνος μπορεί να διακριθεί σε ερυθρό, λευκό και ροζέ. Το ακριβές χρώμα του σχετίζεται με την ποικιλία του σταφυλιού, αλλά και τη διαδικασία οινοποίησης και τρόπου παλαίωσης, όπου αυτή πραγματοποιείται.

Επιπλέον, διαφοροποίηση των παραγόμενων οίνων δίνει η περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Με βάση τα επίπεδα των σακχάρων, διακρίνουμε ξηρούς, ημίξηρους, ημίγλυκους και γλυκούς οίνους.

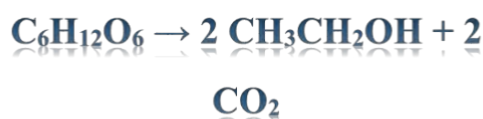
Τέλος, η συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα διαφοροποιεί τους οίνους σε επιπλέον κατηγορίες οι οποίες είναι ήσυχτοι, ημιαφρώδεις και αφρώδεις (Τσετούρας, 2008).

1.1.5 Διαδικασία παραγωγής οίνου

Η δημιουργία οίνου είναι μια πολύ μελετημένη διαδικασία με καθορισμένα βήματα, τα οποία είναι η συγκομιδή των σταφυλιών, η σύνθλιψη του καρπού, η ζύμωση, η διαύγαση, η ωρίμανση, όπου δύναται να πραγματοποιηθεί και τέλος η εμφιάλωση. Κατά τον τρύγο ο τρόπος συλλογής και φύλαξης του καρπού, αλλά και το στάδιο της ωρίμανσης κατά τη συγκομιδή του από το δέντρο, θα δώσει στην συνέχεια χαρακτηριστικές γεύσεις και αρώματα στον παραγόμενο οίνο, καθώς επηρεάζει την οξύτητα και τη γλυκύτητα. Η συλλογή του καρπού μπορεί να γίνει από το δέντρο της αμπέλου είτε με φυσικό / χειρωνακτικό τρόπο είτε με εξειδικευμένα μηχανήματα. Στη συνέχεια ο καρπός μεταφέρεται και γίνεται ο διαχωρισμός των στέμφυλων και η σύνθλιψη του καρπού σε ειδικά μηχανήματα διάτρητων ανοξείδωτων θραυστήρων υψηλών στροφών. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η παραγωγή του μούστου. Ο μούστος περιέχει τον χυμό, αλλά και τα στερεά μέρη του σταφυλιού (φλούδες και σπόροι). Στο σημείο αυτό διαχωρίζεται η ερυθρή από τη λευκή οινοποίηση. Στην ερυθρή οινοποίηση το σύνολο του παραπάνω προϊόντος περνά στην επόμενη φάση, ενώ στην λευκή οινοποίηση, γίνεται διαχωρισμός του χυμού από τα υπόλοιπα. Με την απομάκρυνση των στερεών καταλοίπων σταματά και η μεταφορά χημικών ουσιών από αυτά στον παραγόμενο οίνο. Για παράδειγμα, οι ανθοκυανίνες

στις οποίες οφείλεται το κόκκινο χρώμα των οίνων, βρίσκονται κατά κύριο λόγο στη φλούδα του σταφυλιού, επομένως δεν περνάνε στο παραγόμενο προϊόν μιας λευκής οινοποίησης. Επόμενο στάδιο της διαδικασίας είναι αυτό της διαύγασης του λευκού μούστου. Κατά τη διαδικασία αυτή γίνεται η καθίζηση των σωματιδίων που υπάρχουν μέσα στο χυμό με τη βοήθεια ψυκτικών συστημάτων που μειώνουν τη θερμοκρασία ή και συστημάτων φυγοκέντρωσης. Με τη μείωση της θερμοκρασίας αναστέλλεται η αλκοολική ζύμωση μέχρι να γίνει η απομάκρυνση των στερεών μερών του μούστου.

σον αφορά την ερυθρή οινοποίηση, αυτή πραγματοποιείται μαζί με τα στερεά συστατικά του μούστου τα οποία και θα του προσδώσουν εντελώς διαφορετικά χαρακτηριστικά χρώματος, γεύσης και υφής. Στη συνέχεια ακολουθεί το βήμα της αλκοολικής ζύμωσης, όπου τα σάκχαρα του μούστου μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η αντίδραση που πραγματοποιείται από τις ζύμες είναι η ακόλουθη:



όπου

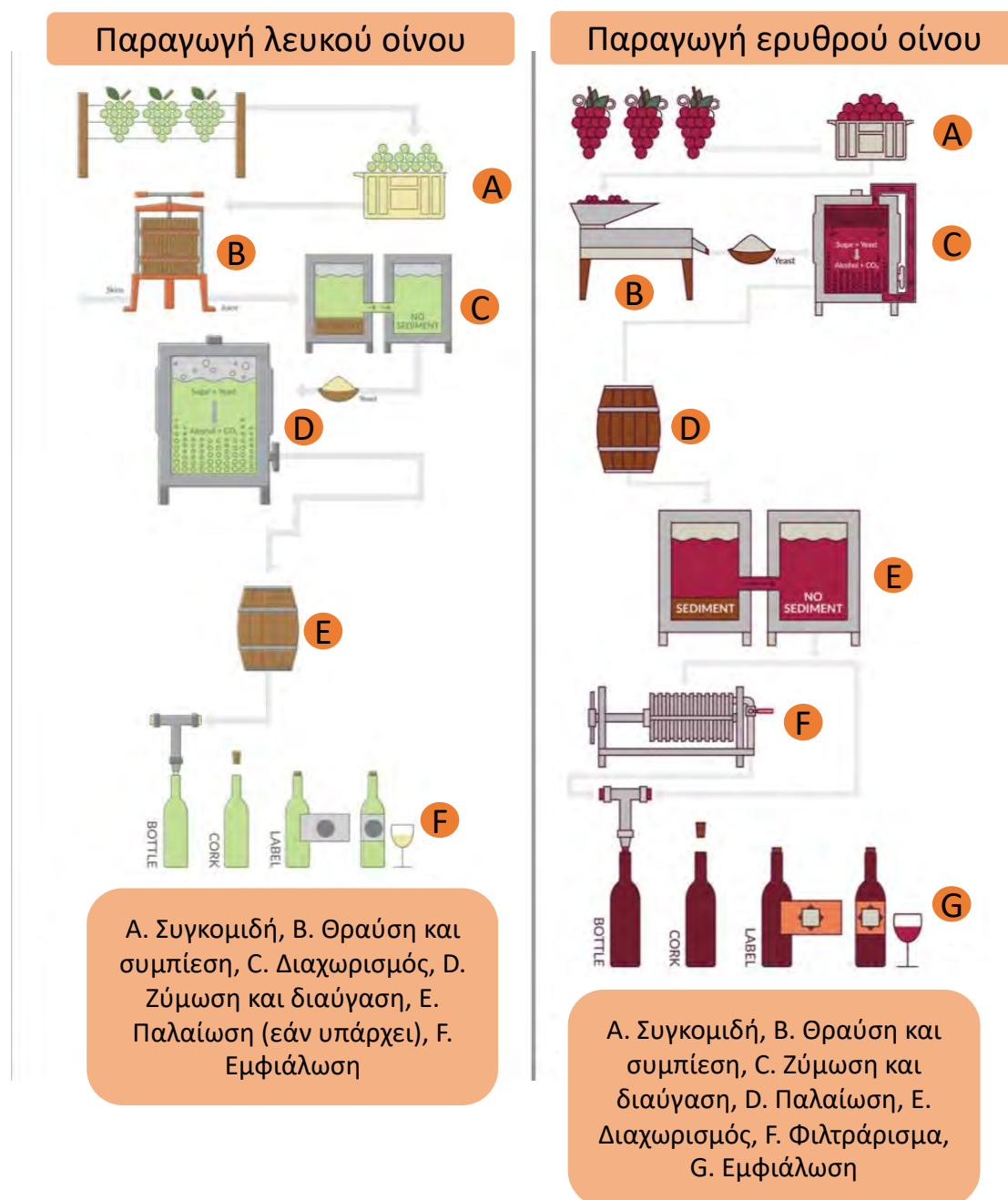
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ η γλυκόζη

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ η αιθανόλη

Εικόνα 3: Παραγωγή αιθανόλης από ζυμομύκητες.

Μετά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, πραγματοποιείται η διαύγαση. Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται με τη βοήθεια φίλτρου από το οποίο περνάει ο μούστος και το οποίο παρακρατεί τους νεκρούς ζυμομύκητες, ταννίνες και πρωτεΐνες. Τελευταίο βήμα είναι η

παλαίωση, εάν πραγματοποιείται, και η εμφιάλωση του οίνου (Τσετούρας, 2008). Παρακάτω παρουσιάζεται μια σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής λευκού και ερυθρού οίνου με τα επιμέρους στάδια.



Εικόνα 4: Διαδικασία παραγωγής λευκού και ερυθρού οίνου (How Red Wine Is Made | Wine Enthusiast, n.d.; How White Wine Is Made | Wine Enthusiast Magazine, n.d.).

1.1.6 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται αυθόρμητα υπό φυσιολογικές συνθήκες. Εάν αφήσουμε το μούστο μόνο του θα ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης, καθώς υπάρχουν πολλά σάκχαρα και η ζυμωτική χλωρίδα που υπάρχει, αρχίζει να μετατρέπει τα σάκχαρα σε αιθανόλη. Εάν δεν προστεθεί ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, που κατά κύριο λόγο είναι υπεύθυνος για τη μετατροπή του

μούστου σε οίνο, τότε η διαδικασία θα σταματήσει αρκετά νωρίτερα από όσο θα έπρεπε. Επισημαίνεται στο σημείο αυτό ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* δεν αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας των σταφυλιών, αλλά προστίθεται από τον οινοποιό.

Το υπόστρωμα καθώς και το τελικό προϊόν κατά την αλκοολική ζύμωση είναι οργανικές ενώσεις, ενώ η ίδια η διαδικασία είναι αναερόβια. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη είναι τα δύο σάκχαρα που μετατρέπονται σε αιθανόλη μέσω της μεταβολικής διαδικασίας που ονομάζεται γλυκόλυση. Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται από τον *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο *Oenococcus oeni*. Τα συγκεκριμένα στελέχη είναι αρκετά ανθεκτικά τόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις της παραγόμενης αιθανόλης, αλλά και σε υψηλά επίπεδα οξύτητας (κυρίως ο *Saccharomyces cerevisiae*). (Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google)

Εάν αφεθεί η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης να γίνει μόνη της, τότε αυτή πραγματοποιείται από άλλα είδη ζυμών, όπως αυτά του γένους *Candida*, *Kloeckera* και *Hanseniaspora*. Με σκοπό την καταστολή της ανάπτυξης τέτοιων στελεχών, οι οινοποιοί χρησιμοποιούν διοξείδιο του θείου και στη συνέχεια προσθέτουν στο μούστο εξωγενώς τον *Saccharomyces cerevisiae* υπό μορφή ξηρής ζύμης, ο οποίος είναι ανθεκτικός στην παρουσία του διοξειδίου του θείου. Φυσικά εάν ένα οινοποιείο το επιθυμεί, μπορεί να διατηρήσει την αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση, χωρίς την προσθήκη του *Saccharomyces cerevisiae*, κάτι που θεωρείται ότι προσδίδει πιο φυσικά αλλά και διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Victoria Moreno-Arribas & Polo, n.d.). Η παραπάνω διαδικασία είτε αυθόρμητη είτε με την προσθήκη του *Saccharomyces cerevisiae* λαμβάνει χώρα σε δεξαμενές διαλείποντος έργου πλήρους αναμίξεως. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση των θρεπτικού υποστρώματος είναι φθίνουσα κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, ξεκινάει με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στην αρχή και φθίνει διαρκώς μέχρι τα περισσότερα σάκχαρα να μεταβολιστούν και να παραχθεί ο ξηρός οίνος. Ο *Saccharomyces cerevisiae* δεν ακολουθεί την κανονική καμπύλη ανάπτυξης μιας ζύμης. Η περίοδος προσαρμογής ουσιαστικά δεν υπάρχει, ενώ η εκθετική αύξηση είναι πολύ σύντομη. Προτού αρχίσουν να μειώνονται δραματικά τα θρεπτικά ήδη ο ζυμομύκητας βρίσκεται σε στατική φάση και η φάση θανάτου είναι παρατεταμένη (Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google). Η μεταφορά των τελικών προϊόντων αιθανόλης και του

διοξειδίου του άνθρακα έξω από το κύτταρο γίνεται με διάχυση χωρίς περεταίρω ενεργειακό κόστος (Victoria Moreno-Arribas & Polo, n.d.).

1.1.6.1 Ανάπτυξη

Φυσιολογικά, εάν δεν πραγματοποιηθεί εμβολιασμός με *Saccharomyces cerevisiae*, ο αρχικός πληθυσμός ζύμης είναι περίπου 10^4 κύτταρα/ml ή υψηλότερος. Εάν το οινοποιείο επιλέξει να προσθέσει έτοιμη ξηρή ζύμη *S. Cerevisiae* τότε η συγκέντρωση που επιλέγεται είναι έως και 5×10^6 κύτταρα/ml. Μετά από μια πολύ σύντομη περίοδο προσαρμογής στις νέες συνθήκες αρχίζει η αλκοολική ζύμωση (φάση ανάπτυξης) με κατανάλωση σακχάρων και άλλων θρεπτικών του μούστου ώστε να αυξηθεί ο πληθυσμός της ζύμης ο οποίος μπορεί να φτάσει έως και 10^8 κύτταρα/ml σε περίοδο τριών έως έξι ημερών. Η φάση αυτή επηρεάζεται από διάφορες συνθήκες όπως είναι η παρουσία οξυγόνου στη ζύμωση, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, καθώς και η συγκέντρωση αμμωνίας μέσα στη δεξαμενή. Μετά τη φάση αυτή, ο πληθυσμός αρχίζει να μένει σταθερός, καθώς δεν υπάρχουν πλέον διαθέσιμα όλα τα θρεπτικά και μικροθρεπτικά και η περίοδος αυτή της στατικής φάσης μπορεί να διαρκέσει έως και δέκα ημέρες. Η επόμενη φάση, αυτή του θανάτου σηματοδοτεί και την αρχή μείωσης του πληθυσμού της ζύμης μέχρι πλήρους θανάτωσης λόγω της μεγάλης έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, αλλά και της μεγάλης συγκέντρωσης τοξικών ουσιών για τις ζύμες (Victoria Moreno-Arribas & Polo, n.d.).

1.1.6.2 Μηλογαλακτική ζύμωση

Η μετατροπή του L- μηλικού οξέος σε L- γαλακτικό οξύ είναι μια ζύμωση που ακολουθεί της αλκοολικής και ονομάζεται μηλογαλακτική. Τη μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιεί κυρίως το βακτήριο *Oenococcus oeni*. Το βακτήριο αυτό εμφανίζει ανθεκτικότητα στις συνθήκες που έχει ο οίνος, δηλαδή υψηλά επίπεδα διοξειδίου του θείου (50 mg/l), χαμηλό pH (<3,5), καθώς και υψηλά επίπεδα αλκοόλ (>10%) (Victoria Moreno-Arribas & Polo, n.d.).

1.1.7 Συστατικά οίνου

Τα συστατικά που βρίσκονται στον προς κατανάλωση οίνο προέρχονται κυρίως από τη μεταβολική δραστηριότητα που έχει ο *S. cerevisiae*. Στον οίνο περιέχεται κατά κύριο λόγο νερό και αλκοόλ με τη μορφή αιθανόλης. Από μικροσυστατικά υπάρχουν

τουλάχιστον 20 ουσίες που προσδίδουν γεύση, ενώ έχουν βρεθεί περισσότερες από 700 ενώσεις που προσδίδουν άρωμα σε διάφορους οίνους ανά τον κόσμο (Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google).

1.1.7.1 Νερό

Το κύριο συστατικό τόσο των σταφυλιών αλλά και του οίνου είναι το νερό. Αυτό, διαδραματίζει καίριο ρόλο στα τελικά οργανοληπτικά στοιχεία που θα έχει ο παραγόμενος οίνος, καθώς μόνο υδατοδιαλυτές ουσίες δίνουν χαρακτηριστικά στο ποτήρι.

1.1.7.2 Σάκχαρα

Μια υποκατηγορία υδατανθράκων είναι τα σάκχαρα. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι η υδροξυλικές ομάδες που διαθέτουν όπως επίσης και μια μονάδα αλδεϋδης ή κετόνης. Τα σάκχαρα έχουν τη δυνατότητα να ενωθούν και να δώσουν πολυμερή σακχάρων. Στα ώριμα σταφύλια συναντώνται η γλυκόζη, καθώς και η φρουκτόζη σε ισόποσες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, το συνολικό ποσοστό των σακχάρων στο φρούτο διαφοροποιείται από πολλούς παράγοντες όπως το στάδιο ωρίμανσης, το ακριβές είδος του δέντρου, καθώς και την ποικιλία που επιλέγεται. Τα σάκχαρα αποτελούν το βασικό συστατικό για την αλκοολική ζύμωση, καθώς χωρίς αυτά δεν αναπτύσσεται και δεν μεταβολίζει ο ζυμομύκητας και δεν παράγει την αιθανόλη. Άλλα προϊόντα της ζύμωσης των σακχάρων είναι αλδεϋδες, ανώτερες αλκοόλες, καθώς και εστέρες λιπαρών οξέων (Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google).

1.1.7.3 Αλκοόλες

Η κυριότερη αλκοόλη στον οίνο είναι η αιθανόλη, η οποία μπορεί να φτάσει σε ποσοστό μέχρι και 15% μέσα στον οίνο με τη λήξη της αλκοολικής ζύμωσης. Περισσότερη ποσότητα αλκοόλης μπορεί να παραχθεί στη συνέχεια με την προσθήκη έξτρα σακχάρων στη δεξαμενή της ζύμωσης. Η παραγωγή της σταματά από την ίδια, καθώς η αυξανόμενη συγκέντρωσή της προκαλεί την αναστολή της ανάπτυξης των ζυμομυκήτων που την παράγουν. Επιπλέον, παράγοντες που σχετίζονται με την παραγωγή της είναι η περιεκτικότητα σε σάκχαρα, το στέλεχος του ζυμομύκητα που

χρησιμοποιείται, καθώς και η θερμοκρασία. Στην παραγόμενη αλκοόλη διαλύονται και όλες οι πολικές αρωματικές ενώσεις.

1.1.7.4 Οξέα

Στον παραγόμενο οίνο συναντώνται διάφορα οξέα με κυριότερα τα ανόργανα οξέα, καρβονικά ή θειώδη, τα οποία συναντώνται και σε αέρια μορφή διοξειδίου του άνθρακα και διοξειδίου του θείου, χωρίς ωστόσο να επηρεάζουν το pH, το οποίο στους ερυθρούς οίνους βρίσκεται μεταξύ 3,3 – 3,6 και στους λευκούς μεταξύ 3,1 – 3,4. Εκτός των παραπάνω οξέων μπορούν να υπάρχουν και άλλα όπως το ταρταρικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ και το μαλικό οξύ.

1.1.7.5 Φαινόλες και φαινολικά παράγωγα

Μια άλλη μεγάλη κατηγορία ουσιών με ιδιαίτερη σημασία για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων είναι οι φαινόλες. Οι ουσίες αυτές φέρουν τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα επί του βενζολικού τους δακτυλίου. Παρά την ύπαρξη υδροξυλομάδες, οι φαινολικές ενώσεις δεν διαθέτουν τα χαρακτηριστικά των αλειφατικών αλκοολών. Οι βασικότερες φαινολικές ενώσεις που απαντώνται στον οίνο είναι τα φλαβονοειδή (φλαβονόλες, κατεχίνες, ανθοκυανίνες και μικρές ποσότητες λευκοανθοκυανινών-μόνο στους ερυθρούς οίνους) και οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις (παράγωγα του υδροξυκιναμικού και υδροξυβενζοϊκού οξέος, τυροσόλη, υδροτυροσόλη, στιλβένια κ.ά.) (Nemzer et al., 2021).

Τα φλαβονοειδή απαντώνται είτε ελεύθερα είτε ως πολυμερή. Τα πολυμερή μπορούν να σχηματίζουν ενώσεις είτε μεταξύ τους, είτε με σάκχαρα είτε με μη φλαβονοειδή ή / και σε συνδυασμούς των παραπάνω και ονομάζονται ταννίνες. Αυτές βρίσκονται φυσικά στα φυτά με σκοπό να τα προστατέψουν από παθογόνα. Επιπλέον, οι φλαβονόλες που βρίσκονται κυρίως στο φλοιό του φρούτου, έχουν την ιδιότητα να συγκρατούν την υπεριώδη ακτινοβολία και με αυτό τον τρόπο να προστατεύουν τα πολύτιμα συστατικά του χυμού, καθώς και τον καρπό. Στον οίνο, συνεισφέρουν, επίσης, στο χρώμα του μαζί με της ανθοκυανιδίνες. Στους ερυθρούς οίνους τα φλαβονοειδή αποτελούν το 85% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου τους και βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1 g/l. Στους λευκούς οίνους η συνεισφορά στα συνολικά φαινολικά είναι αρκετά μικρότερη, περίπου 20%, με

συγκεντρώσεις μικρότερες από 50 mg/l. Το υπόλοιπο 20% στους ερυθρούς οίνους και 80% στους λευκούς είναι μη φλαβονοειδή (Lingua et al., 2016).

Στα μη φλαβονοειδή συμπεριλαμβάνονται χαμηλότερης πολυπλοκότητας ενώσεις που αποτελούνται από 3 έως 6 άτομα άνθρακα. Τα μη φλαβονοειδή προέρχονται από τα σταφύλια, ενώ μικρότερες ποσότητες μεταφέρονται από τα ίδια τα βαρέλια όπου γίνεται η παλαίωση στον οίνο. Ακόμα, μικρές ποσότητες μπορούν να προκύψουν και από το μεταβολισμό των ζυμών, με κυρίαρχη την ένωση της τυροσόλης. Γενικά, τα μη φλαβονοειδή αποτελούν παράγωγα του υδροξυκιναμικού και υδροξυβενζοϊκού οξέος, με τα πρώτα να απαντώνται σε φρέσκους οίνους, ενώ όσο περισσότερο μένει ο οίνος σε βαρέλια τόσο αυξάνονται τα επίπεδα του υδροξυβενζοϊκού οξέος (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

Συνολικά, το φαινολικό περιεχόμενο ενός οίνου παρότι ξεκινάει κατά τη διαδικασία της ζύμωσης σε υψηλές συγκεντρώσεις, μειώνεται συστηματικά καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, ωρίμανσης και παλαίωσης, καθώς οι φαινόλες συνεχώς οξειδώνονται και πολυμερίζονται, σχηματίζοντας ίζημα στον πάτο των βαρελιών και φιαλών (Monagas et al., 2006; Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google; X. Zhang et al., 2020).

1.1.7.6 Βιταμίνες

Αν και σε μικρές ποσότητες, αρκετές βιταμίνες συναντώνται τόσο στα σταφύλια όσο και στον οίνο. Οι βιταμίνες αυτές χρησιμοποιούνται από τις ζύμες κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης και ως εκ τούτου στο τελικό προϊόν δεν είναι σε συγκεντρώσεις ικανές να θεωρηθούν ότι συμβάλουν στην υγεία του ανθρώπου. Η μόνη βιταμίνη που απομένει στο τέλος της ζύμωσης, καθώς συντίθεται από τις ζύμες, είναι το π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), αλλά και αυτό παραμένει σε μη σημαντικά επίπεδα για τον άνθρωπο (Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google).

1.1.7.7 Αέρια

Στον οίνο συναντώνται σε διαλυμένη μορφή το διοξείδιο του άνθρακα και του θείου, καθώς και οξυγόνο. Τα διοξείδιο του άνθρακα και το διοξείδιο του θείου είναι προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης και παράγονται από τους ζυμομύκητες. Το πρώτο,

διαφεύγει κατευθείαν στην ατμόσφαιρα, ενώ το δεύτερο παραμένει στον οίνο και απαντάται σε σημαντικές ποσότητες (12 έως 64 mg/l) διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο. Αρχικά, βοηθάει στον περιορισμό της αμαύρωσης του οίνου, ενώ είναι ικανό να δράσει και ως αντιμικροβιακό, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών διαφόρων πρωτεϊνών και ενζύμων ή/και στη σύνδεση με λιπίδια τα οποία καθίστανται μη λειτουργικά. Επιπλέον, παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση μέσω της ικανότητας αναστολής της ανάπτυξης αδρανών ζυμών, οι οποίες παρουσιάζουν έντονη ευαισθησία στην παρουσία διοξειδίου του θείου. Τέλος το SO₂ παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, βοηθώντας ουσιαστικά στη μείωση της οξείδωσης των φαινολικών με ταυτόχρονη αναγωγή του H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο. Πολλά οινοποεία επιλέγουν να προσθέσουν επιπλέον υγροποιημένο αέριο διοξειδίου του θείου για περαιτέρω προστασία. Παρόλα αυτά με το πέρασ του χρόνου μειώνεται η συγκέντρωσή του στις φιάλες οίνου με αποτέλεσμα να μειώνεται και η αντιοξειδωτική του δράση (Victoria Moreno-Arribas & Polo, n.d.; Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google).

1.1.7.8 Αμινοξέα και βιογενείς αμίνες

Οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια και τα αμινοξέα αποτελούν τα κύρια αζωτούχα στοιχεία στον οίνο. Τα συστατικά αυτά είναι βασικά θρεπτικά για τους ζυμομύκητες και τα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Ειδικότερα, 20 διαφορετικά αμινοξέα απαντώνται στο μούστο και αποτελούν περίπου το 1/3 του συνολικού αζώτου. Επιπλέον, ενώσεις αζώτου είναι οι βιογενείς αμίνες που προέρχονται από αρωματικά αμινοξέα και υπάρχουν φυσιολογικά στο μούστο, καθώς είναι απαραίτητες για τη λειτουργία των φυτών, ζώων και μικροοργανισμών (Victoria Moreno-Arribas & Polo, n.d.).

1.1.7.9 Πεπτίδια

Τα πεπτίδια είναι μια κατηγορία ενώσεων που παρουσιάζουν πολλά και διαφορετικά χαρακτηριστικά. Κύριο γνώρισμα των πεπτιδίων που απαντώνται στον οίνο είναι ότι εκτός του ότι αποτελούν θρεπτική πηγή για τους ζυμομύκητες, εμφανίζουν αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, και κυρίως αντιυπερτασική δράση στον άνθρωπο. Η αντιυπερτασική δράση των πεπτιδίων βασίζεται στην ικανότητα αναστολής του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE - Angiotensin-converting enzyme), το οποίο αυξάνει την αρτηριακή πίεση με τη μετατροπή της

αγγειοτενσίνης I, ενός ισχυρού αγγειοσυστολέα, σε αγγειοτενσίνη II, αλλά και με την ικανότητα καταστροφής της βραδυκινίνης, ενός αγγειοδιαστολέα (Pozo-Bayón et al., 2007).

1.1.8 Οινοποιητικές ποικιλίες αμπέλου που μελετήθηκαν

1.1.8.1 Ερυθρές ποικιλίες

1.1.8.1.1 Ξινόμαυρο



Εικόνα 5: Σταφύλια ποικιλίας Ξινόμαυρου(Ξινόμαυρο - Wines of Greece, n.d.).

Το Ξινόμαυρο είναι μια πολυδύναμη Ελληνική ποικιλία που μπορεί να δώσει οίνους πολλών ειδών από ερυθρωπούς και ερυθρούς μέχρι αφρώδεις. Ως ποικιλία, το Ξινόμαυρο έχει δυσκολία στην καλλιέργεια και χρειάζεται συγκεκριμένα εδάφη πλούσια σε ασβέστιο και υγρασία και ευνοϊκές κλιματολογικές συνθήκες ώστε να αναπτυχθεί. Για παράδειγμα, δεν αναπτύσσεται σε άνυδρες συνθήκες, είναι ευαίσθητο στη μούχλα, την ερυσίβη, και τον βοτρυτή. Οι οίνοι που παράγονται από Ξινόμαυρο μπορούν να παλαιωθούν από λίγα χρόνια μέχρι και δεκαετίες. Ένας αμπελώνας Ξινόμαυρου ενδείκνυται να έχει περίπου 4.000 φυτά ανά εκτάριο γης. Κρίσιμης σημασίας είναι επίσης η επιλογή των κατάλληλων κλώνων, καθώς διαφορετικοί κλώνοι δίνουν διαφορετικούς χρόνους ωρίμανσης, διαφορετικά μεγέθη στα τσαμπιά και διαφορετικά μεγέθη στα φύλλα. Τέλος, με βάση την επιλογή του κλώνου ο ίδιος ο καρπός θα έχει διαφορετικό χρώμα αλλά και μέγεθος. Πλέον, τα περισσότερα οινοποιεία επιλέγουν πολλούς και διαφορετικούς κλώνους για μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Συχνό θέμα που δημιουργείται με τη συγκεκριμένη ποικιλία είναι η ωρίμανση των σακχάρων και των ταννινών (Lazarakis, 2005; Ξινόμαυρο - Wines of Greece).

1.1.8.1.2 Αγιωργίτικο



Εικόνα 6: Σταφύλα ποικιλίας Αγιωργίτικου (Αγιωργίτικο - Wines of Greece, n.d.).

Το Αγιωργίτικο αποτελεί, μαζί με το Ξινόμαυρο, τις δύο ερυθρές ποικιλίες με τη μεγαλύτερη αναγνώριση στις διεθνείς αγορές και διαγωνισμούς. Πρόκειται, επίσης, για μία πολυδύναμη ποικιλία που έχει την ικανότητα να δώσει πλήθος ερυθρωπών και ερυθρών οίνων. Ιδιαίτερη ευαισθησία παρουσιάζει σε ικές μολύνσεις (δεν υπάρχουν κλώνοι απαλλαγμένοι από ικά σωματίδια), ενώ ευαισθησία παρουσιάζει και στη μούχλα, την ερυσίβη και την υγρασία. Για να δημιουργηθούν καλοί ποιοτικά καρποί είναι απαραίτητο το φυτό να περάσει από φάση έντονου στρες. Για το σκοπό αυτό το Αγιωργίτικο έχει πυκνή φύτευση με 5.000 δέντρα ανά εκτάριο γης, η οποία πρέπει να είναι άνυδρη και άγονη. Επιπλέον, για την καλύτερη ωρίμανση του καρπού σε αρώματα και φαινολικές ενώσεις είναι προτιμότερο τα παραπάνω αμπελοτόπια να βρίσκονται και σε υψηλά υψόμετρα (Lazarakis, 2005; Αγιωργίτικο - Wines of Greece).

1.1.8.2 Λευκές ποικιλίες

1.1.8.2.1 Ασύρτικο



Εικόνα 7: Σταφύλια ποικιλίας Ασύρτικο(Ασύρτικο - Wines of Greece, n.d.).

Το Ασύρτικο είναι η σημαντικότερη λευκή ποικιλία της χώρας και μια από τις καλύτερες στην περιοχή της Μεσογείου. Έχει χαρακτηριστικά υψηλή οξύτητα με $pH < 3$. Το κλήμα είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό σε πολλές ασθένειες και στην ξηρασία και μπορεί να αντέξει σε κλιματικές αλλαγές και διάφορους τύπους εδάφους. Σε φυσιολογικές συνθήκες είναι δυνατόν να παράξει έως και έξι τόνους οίνο ανά εκτάριο γης. Ο σκληρός φλοιός που διαθέτει του προσφέρει προστασία από τους έντονους ανέμους του Αιγαίου πελάγους. Τέλος, το Ασύρτικο μπορεί να καταναλωθεί κατευθείαν, καθώς δεν χρειάζεται ωρίμανση σε βαρέλι, παρότι έχει τη δυνατότητα να παλαιωθεί μέχρι και πάνω από πέντε έτη προσφέροντας έτσι ξηρές επιλογές (Lazarakis, 2005; Ασύρτικο - Wines of Greece, n.d.).

1.1.8.2.2 Μαλαγουζιά



Εικόνα 8: Σταφύλια ποικιλίας Μαλαγουζιά (Μαλαγουζιά - Wines of Greece, n.d.).

Η Μαλαγουζιά μέχρι το 1970 θεωρούνταν εξαφανισμένη ποικιλία. Ο καθηγητής της Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Λογοθέτης την καλλιέργησε σε μία μικρή έκταση του κτήματος Πόρτο Καρράς στη Χαλκιδική μαζί με κάποιες ακόμα σπάνιες ποικιλίες που είχε απομονώσει από όλη τη χώρα, τις οποίες όμως οινοποιούσε όλες μαζί. Η συγκεκριμένη Μαλαγουζιά που καλλιέργησε προερχόταν από την Αιτωλοακαρνανία. Ωστόσο, η ανακάλυψη του τόσο ιδιαίτερου χαρακτήρα της Μαλαγουζιάς, όπως επίσης και η μετέπειτα εξάπλωση και εμπορική εκμετάλλευσή της οφείλεται καταρχήν στον Ευάγγελο Γεροβασιλείου, το ίδιο το κτήμα Πόρτο Καρράς και στη Ρωξάνη Μάτσα, του ομώνυμου κτήματος. Η Μαλαγουζιά είναι ευαίσθητη στην ξηρασία, ενώ ο τρύγος της πραγματοποιείται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης με επακόλουθο την ύπαρξη διαφορετικών αρωμάτων στο τελικό προϊόν. Ο οίνος που παράγεται από την ποικιλία αυτή σταφυλιών μπορεί να είναι φρέσκος, ενώ υπάρχει και η δυνατότητα παλαίωσης σε δρύινα βαρέλια (Lazarakis, 2005; Μαλαγουζιά - Wines of Greece, n.d.).

1.1.8.3 ΠΟΠ – ΠΓΕ προϊόντα

Οι γεωγραφικές ενδείξεις κατοχυρώνουν δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας για συγκεκριμένα προϊόντα, τα οποία έχουν χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το μέρος από όπου έχουν προέλθει.

Οι γεωγραφικές ενδείξεις περιλαμβάνουν:



Εικόνα 9: Αριστερά το ευρωπαϊκό σήμα για τα ΠΟΠ, δεξιά το ευρωπαϊκό σήμα για τα ΠΓΕ (EAmbrosia, n.d.; Geographical Indications and Quality Schemes Explained, n.d.; Οίνους ΠΟΠ-ΠΓΕ, n.d.).

ΠΟΠ — προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (τρόφιμα και οίνους)

ΠΓΕ — προστατευμένη γεωγραφική ένδειξη (τρόφιμα και οίνους)

Το παραπάνω σύστημα δημιουργήθηκε από την Ευρωπαϊκή

Ένωση με σκοπό να προστατεύσει τα προϊόντα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και παράδοση που σχετίζονται με τον τόπο παραγωγής τους.

Η διαφορά των προϊόντων με προστατευόμενη ονομασία προέλευσης και των προϊόντων με προστατευμένη γεωγραφική ένδειξη σχετίζεται με την ποσότητα των πρώτων υλών που είναι υποχρεωτικό να είναι από την περιοχή της ονομασίας προέλευσης ή της γεωγραφικής ένδειξης, καθώς και με το βαθμό που η παραγωγή είναι υποχρεωμένη να γίνεται μέσα σε μία συγκεκριμένη έκταση που προστατεύεται από την ονομασία προέλευσης ή τη γεωγραφική ένδειξη. (EAmbrosia; Geographical Indications and Quality Schemes Explained; Οίνους ΠΟΠ-ΠΓΕ).

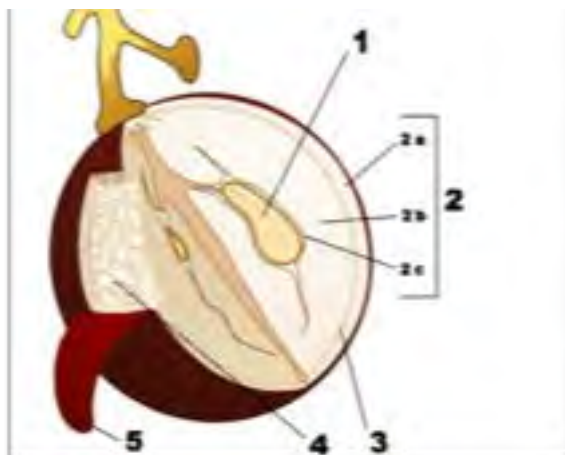
Οι 4 ποικιλίες που μελετώνται συνεισφέρουν στις παρακάτω ΠΟΠ και ΠΓΕ ενδείξεις:

Πίνακας 2: ΠΟΠ και ΠΓΕ στις 4 εξεταζόμενες ποικιλίες (Αγιωργίτικο - Wines of Greece, n.d.; Ασύρτικο - Wines of Greece, n.d.; Μαλαγουζιά - Wines of Greece, n.d.; Ξινόμαυρο - Wines of Greece, n.d.).

Ξινόμαυρο	Αγιωργίτικο	Ασύρτικο	Μαλαγουζιά
ΠΟΠ Νάουσα	ΠΟΠ Νεμέα	ΠΟΠ Σαντορίνη	ΠΟΠ Ρόδος
ΠΟΠ Αμύνταιο		ΠΟΠ Πλαγιές Μελίτων	
ΠΟΠ Γουμένισσα		ΠΟΠ Χάνδακας	
ΠΟΠ Ραψάνη		ΠΟΠ Ρόδος	
		ΠΟΠ Μονεμβασία	
		ΠΟΠ Malvasia Πάρος	
		ΠΟΠ Malvasia Σητεία	
		ΠΟΠ Malvasia Χάνδακας	

1.1.9 Το αμπέλι και το σταφύλι

Το αμπέλι είναι ένας φυτικός οργανισμός που ανήκει στη συνομοταξία των αγγειόσπερμων και την ομοταξία των δικοτυλήδωνων. Επιπλέον, η τάξη του ανήκει στα αμπελώδη, η οικογένειά του στην άμπελο, ενώ το είδος του είναι το *Vitis vinifera*. Ο καρπός που παράγει το αμπέλι ή κλίμα είναι το σταφύλι, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή του οίνου. Το σταφύλι είναι ένα σαρκώδες φρούτο με σπόρο στο εσωτερικό του. Τα σταφύλια μεγαλώνουν σε συστάδες, οι οποίες ονομάζονται τσαμπιά. Κάθε σταφύλι το οποίο ονομάζεται και ρώγα ή ράγα, επικοινωνεί απευθείας με το στέλεχος του φυτού με τη βοήθεια ενός κοτσανιού (βόστρυχος). Η κάθε διαφορετική ποικιλία δίνει και βόστρυχους με μακρύ ή κοντό μήκος. Στην παραγωγή του οίνου, χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο ποικιλίες με κοντό μήκος βόστρυχου που σχηματίζουν συμπαγή τσαμπιά (Ribéreau-Gayon et al., n.d.).



Εικόνα 10: Ανατομία ράγας σταφυλιού: 1. Κουκούτσι 2. Περικάρπιο [2a. Εξωκάρπιο 2b. Μεσοκάρπιο 2c. Ενδοκάρπιο] 3. 4. Αγγειώδεις δεσμίδες 5. Φλοιός (File: Wine Grape Diagram En.Svg - Wikimedia Commons, n.d.).

Κάθε ράγα της αμπέλου αποτελείται από το φλοιό, το μεσοκάρπιο, το αγγειακό σύστημα και τα γίγαρτα (κουκούτσια). Ο φλοιός αποτελεί το εξωτερικό κάλυμμα της ράγας και διαθέτει τρία διακριτά μέρη. Η εφυμενίδα που αποτελεί το εξωτερικό περίβλημα, περιέχει ολεανολικό οξύ το οποίο είναι η πρώτη άμυνα έναντι των εντόμων και παθογόνων, ενώ παράλληλα προστατεύει από την ακτινοβολία και ρυθμίζει τη διαπνοή. Η επιδερμίδα είναι η περιοχή του φλοιού που περιέχει τα στομάτια και τους χλωροπλάστες και δίνει ξεχωριστά αρώματα ανάλογα την ποικιλία. Τελευταίο μέρος του φλοιού είναι η υποδερμίδα. Διακρίνεται σε δύο μέρη, την εξωτερική και την εσωτερική καθεμία με διακριτά είδη κυττάρων και ρόλων. Τόσο η επιδερμίδα όσο και η υποδερμίδα είναι περιοχές του φλοιού με πλούσιο περιεχόμενο σε πολυφαινόλες, χρωστικές και αρωματικές ουσίες, αλλά και βιταμίνη C. Η περιοχή με τη μεγαλύτερη μάζα της ράγας είναι το μεσοκάρπιο. Αυτό διατηρεί πάνω από το 90% του βάρους της ράγας και περιέχει κυρίως νερό και σάκχαρα. Σε μικρότερο βαθμό ανιχνεύονται και κάποια οξέα. Στον αφορά το αγγειακό σύστημα αυτό αποτελείται από 3 βασικά δίκτυα το εξωτερικό, το εσωτερικό και των γιγάρτων. Τα τελευταία, τα γίγαρτα, είναι το αναπαραγωγικό σύστημα της αμπέλου (Mullins et al., 1992).

Γενικότερα, στα σταφύλια έχουν ανιχνευτεί περισσότερες από 500 ουσίες με τις 150 από αυτές να είναι εστέρες. Μεγάλο μέρος του βάρους τους, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, καταλαμβάνουν το νερό και τα σάκχαρα, ενώ σημαντικός είναι ο αριθμός οργανικών οξέων, αμινοξέων και αρωματικών ενώσεων. Η μεγάλη ποσότητα νερού που περιέχεται είναι καθοριστική για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των σταφυλιών, καθώς περιέχει βιταμίνες όπως A, B και ασκορβικό οξύ (Akimov et al.,

2020). Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 10^{-1} με 10^{-6} mg/l ενώ αυτές που καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά μπορούν να ανιχνευθούν και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 mg/l. Τέλος, το κυριότερο από τα ιχνοστοιχεία που ανιχνεύεται είναι το κάλιο ενώ σε μικρότερες ποσότητες υπάρχουν και άλλα. Ενεργειακά, για κάθε 100 g σταφυλιού (περίπου 10 ράγες) μετρώνται 70 θερμίδες, οι οποίες είναι κυρίως αποτέλεσμα των σακχάρων που περιέχονται.

Η σημαντικότερη κατηγορία ουσιών που συναντώνται στα σταφύλια όσον αφορά τη βιοδραστικότητά τους είναι οι πολυφαινόλες (Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google). Η βασικότερη πολυφαινόλη που ανιχνεύεται είναι η ρεσβερατρόλη, ένα μόριο που ανήκει στην κατηγορία των στιλβενίων. Η ουσία αυτή συναντάται κυρίως στη φλούδα του σταφυλιού και διαθέτει σημαντική αντιοξειδωτική, αντιμεταλλαξιγόνα και αντικαρκινική δράση. Η ρεσβερατρόλη και άλλα στιλβένια, καθώς και οι υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις (ανθοκυανίνες, φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα) που υπάρχουν στα σταφύλια έχουν αναφερθεί ότι, λόγω της βιοδραστικότητάς τους, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευζωία και μακροζωία των ανθρώπων (Howes & Simmonds, 2014; Jang et al., 1997; Xia et al., 2010). Οι ανθοκυανίνες είναι χρωστικές ενώσεις που απαντώνται μόνο στο φλοιό και στα γίγαρτα και προσδίδουν στις ράγες το χαρακτηριστικό τους χρώμα. Τα φαινολικά οξέα συναντώνται κυρίως στα χυμοτόπια σε όλα τα μέρη της ράγας μαζί με τα φλαβονοειδή. Αυτά περιλαμβάνουν ανθοκυανίνες, λευκοανθοκυανίνες, φλαβονόλες και κατεχίνες (Flamini et al., 2013). Οι ανθοκυανίνες και οι φλαβονόλες εντοπίζονται στο φλοιό, ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες κυρίως στα γίγαρτα. Οι ταννίνες που σχηματίζονται από τις προκυανιδίνες σχηματίζουν συσσωματώματα με πρωτεΐνες της σιέλου στο στόμα των ανθρώπων και δημιουργείται η χαρακτηριστική στιφή αίσθηση στα σταφύλια και κυρίως στον οίνο.

Συνολικά, το φαινολικό φορτίο και η βιοδραστικότητα διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το σταφύλι και σχετίζεται άμεσα με τη χρονιά, την περιοχή, την ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, τις καλλιεργητικές πρακτικές, τις ασθένειες κ.α. (Xia et al., 2010) Μια ακόμα επίδραση του σταφυλιού στον άνθρωπο είναι η έντονη διουρητική δράση, λόγο του καλίου που περιέχει, που έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση από τον οργανισμό τοξινών (de Moura et al., 2014, 2016; Gollucke et al., 2018; Handan et al., 2020; Pires et al., 2013).

Η ευεργετική δράση του σταφυλιού και του οίνου ήταν γνωστή και στην αρχαία Ελλάδα, καθώς θεραπείες από 1 έως 4 εβδομάδες αποκλειστικής κατανάλωσης σταφυλιού είναι γνωστές και καταγεγραμμένες. Η βιοδραστικότητα των δύο αυτών προϊόντων αποτυπώνεται και στη σύγχρονη εποχή με το «Γαλλικό Παράδοξο». Το επιδημιολογικό αυτό εύρημα σχετίζεται το γεγονός ότι οι Γάλλοι εμφανίζουν μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης καρδιοπαθειών η οποία συσχετίζεται με τη συνήθειά τους, σε σχέση με τα υπόλοιπα έθνη, να καταναλώνουν ημερησίως μια λελογισμένη ποσότητα ερυθρού οίνου (Criqui & Ringel, 1994; de Gaetano et al., 2003; Gurr, 1992; Hrelia et al., 2023; Rayo Llerena & Marín Huerta, 1998; Renaud & de Lorgeril, 1992a; Segall, 1992; Silva et al., 2022).

1.1.10 Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών και του οίνου

Η βιοδραστικότητα των πολυφαινολών είναι η κύρια πηγή για τις περισσότερες ευεργετικές δράσεις της κατανάλωσης σταφυλιών και οίνου. Αυτά διαθέτουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, εξουδετερώνοντας όλα τα είδη ελευθέρων ριζών,



Εικόνα 11: Βιοδραστικές ιδιότητες οίνου.

προστατεύουν από την υπεροξείδωση των λιπιδίων και τη δημιουργία υδροϋπεροξειδίων (Shanmuganayagam et al., 2007). Επιπλέον, παρουσιάζουν καρδιοπροστατευτική δράση που σχετίζεται με την παρεμπόδιση δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας λόγω της καλύτερης κατάστασης του ενδοθηλίου. Επιπλέον, μειώνεται η οξείδωση της LDL και η συσσωμάτωση αιμοπεταλίων λόγω των

αυξημένων αντιοξειδωτικών στον ορό του αίματος (Chaves et al., 2009; Folts, 2002; Keevil et al., 2000; Pace-Asciak et al., 1996; Vislocky & Fernandez, 2010).

Άλλες μελέτες στον οίνο δείχνουν την ευεργετική επίδρασή του σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον (Vislocky & Fernandez, 2010), καθώς επίσης και στο διαβήτη και την παχυσαρκία που αποτελούν

μάστιγες για τον 21^ο αιώνα, αλλά και στην υπέρταση μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης (Pascual-Serrano et al., 2018; Tankó & Christiansen, 2006; Terra et al., 2009, 2011). Επιπλέον, ο οίνος ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της αντιικής, αντιβακτηριακής και αντιμυκητιακής δράσης που παρουσιάζει, καθώς και της ευεργετικής δράσης κατά του έλκους του στομάχου (Baydar et al., 2006; Cushnie & Lamb, 2005; Friedman, 2014; Soares De Moura et al., 2005; Tankó & Christiansen, 2006). Επιπρόσθετα, η διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης μέσω της ρύθμισης των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο παρουσιάζει αντικαρκινική ιδιότητα. Η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει έντονη αντικαρκινική δραστηριότητα, καθώς αναστέλει τις κυκλοοξυγενάσεις COX-1, COX-2) και την υδροϋπεροξειδική λειτουργία. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι οι αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες προέρχονται από την ενεργοποίηση ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού φαρμάκων (Anand David et al., 2016; Azeem et al., 2022; de Flora & Ramel, 1988; El-Saber Batiha et al., 2020; Kaur et al., 2009; Kopustinskiene et al., 2020; Mirhadi et al., 2021; Ohishi et al., 2021, 2022; Panche et al., 2016; W. Shi et al., 2018; Tavsan & Kayali, 2019).

Πολύ σημαντική είναι και η επίδραση του οίνου στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Η κατανάλωση οίνου αυξάνει σημαντικά τον αριθμό διάφορων βακτηρίων, όπως τα *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifobacterium*, *Bacteroides uniformis*, *Eggerthellalenta* και *Blautiacoccoides* - *Eubacteriumrectal* που θεωρούνται ευεργετικά για την υγεία των ανθρώπων έχοντας προβιοτική δράση, ενώ συμβάλουν και στην απορρόφηση των πολυφαινολών (Dolara et al., 2005; Hoveyda et al., 2009; Hungin et al., 2013; Jacobs et al., 2012; Jiménez-Girón et al., 2013, 2015; Luo et al., 2022; Nash et al., 2018; Ozdal et al., 2016). Τέλος, η κατανάλωση ερυθρού οίνου έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου και όγκων του ουροποιητικού συστήματος (Amor et al., 2018; Andreatta et al., 2010; Magalhães et al., 2011).

1.1.11 Περιοχές που καλλιεργείται το αμπέλι και παραγωγή οίνου

Το αμπέλι ευδοκίμει σε διάφορες περιοχές του πλανήτη. Οι σημαντικότερες χώρες στις οποίες καλλιεργείται είναι η Κίνα, οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, η



Εικόνα 12: Οι 20 χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή σταφυλιού (FAOSTAT, n.d.-b).

Ιταλία, η Γαλλία, η Ισπανία, η Τουρκία, η Χιλή, η Αργεντινή, το Ιράν, η Νότια Αφρική, η Αυστραλία, η Αίγυπτος, η Ελλάδα, η Ινδία, η Βραζιλία, η Γερμανία, η

Ρουμανία, το Αφγανιστάν, η Πορτογαλία και το Ουζμπεκιστάν (FAOSTAT; Statistics | ΟΙΥ).

Η Παγκόσμια παραγωγή οίνου το 2022 (εξαιρουμένων των χυμών και των γλεύκων) με βάση πληροφορίες που συλλέχθηκαν από τον Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου από 29 χώρες και αντιπροσωπεύουν το 91% της παγκόσμιας παραγωγής το 2021, εκτιμάται μεταξύ 257,5 και 262,3 mhl, με εκτίμηση μεσαίου εύρους στα 259,9 mhl (1 mhl = 100.000 τόνοι).

Ο όγκος παραγωγής οίνου το 2022 μπορεί να θεωρηθεί ελαφρώς χαμηλότερος από το μέσο όρο των 20 προηγούμενων ετών καθώς έχει μειωθεί κατά 1% σε σύγκριση με το 2021. Αυτό οφείλεται στον υψηλότερο από τον αναμενόμενο όγκο συγκομιδής στην Ευρώπη (παρά την ξηρασία και τα κύματα καύσωνα κατά την άνοιξη και καλοκαίρι) και το μέσο επίπεδο παραγωγής που καταγράφηκε στο νότιο ημισφαίριο και στις ΗΠΑ. Συνολικά, το 2022 οι ξηρές και ζεστές συνθήκες που παρατηρήθηκαν σε διάφορες περιοχές του κόσμου οδήγησαν σε πρώιμες συγκομιδές και μέσους όγκους, ωστόσο αναμένεται μια συνολική καλή ποιότητα. Πως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, η παγκόσμια παραγωγή οίνου είναι σταθερή γύρω στα 260 mhl για τέσσερα συνεχόμενα έτη.

Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι τα στοιχεία για το 2022, πρέπει να ληφθούν με προσοχή, καθώς υπάρχουν ακόμη μεγάλες χώρες όπως η Κίνα και η Ρωσία για τις οποίες δεν υπάρχουν ακόμη πληροφορίες. Επίσης, η υψηλή μεταβλητότητα των όγκων παραγωγής που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια σε περιφερειακό επίπεδο καθιστά ακόμη πιο δύσκολη την πραγματοποίηση των προβλέψεων (World Wine Production Outlook OIV First Estimates).



Εικόνα 13: Παγκόσμια παραγωγή οίνου κατά τα έτη 2000 έως 2022 σε mhl. (World Wine Production Outlook OIV First Estimates).

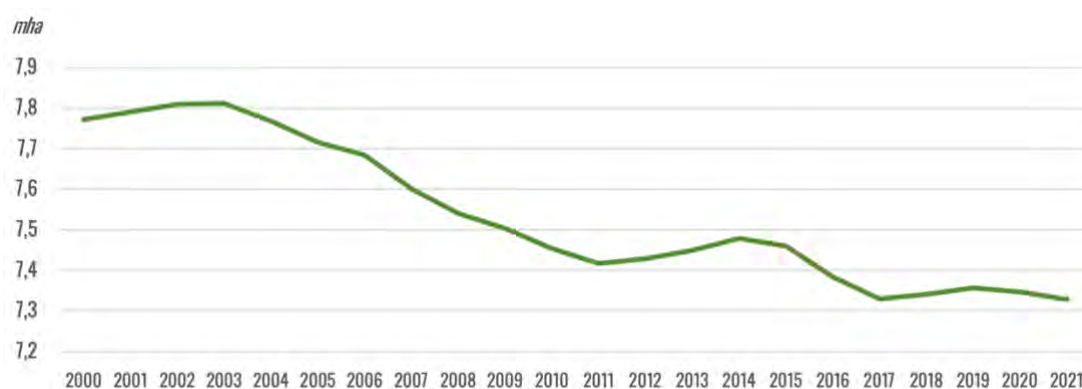
Για την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), μια σειρά από δυσμενή καιρικά φαινόμενα όπως ανοιξιάτικος παγετός, χαλάζι, υπερβολική ζέστη και ξηρασία έχουν παρατηρηθεί καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου του 2022. Οι καύσωνες της άνοιξης και του καλοκαιριού σε όλη την Ευρώπη είχαν ως αποτέλεσμα την πρόωρη ωρίμανση. Στην αρχή της αμπελοκομικής περιόδου, υπήρξε ευρεία ανησυχία μεταξύ των βασικών εμπλεκόμενων μερών ότι οι αποδόσεις αναμενόταν να είναι χαμηλότερες λόγω της υπερβολικής ζέστης και της έλλειψης βροχοπτώσεων σε πολλές περιοχές. Ωστόσο, τελικά, η απουσία μεγάλων ασθενειών των σταφυλιών και οι βροχοπτώσεις στα τέλη του καλοκαιριού οδήγησαν σε υψηλότερες αποδόσεις από τις αρχικά αναμενόμενες σε αρκετές περιοχές και χώρες. Το αποτέλεσμα είναι μια συνολική πρόωμη συγκομιδή και εκτιμώμενος όγκος παραγωγής οίνου 157 mhl, εξαιρουμένων των χυμών και των γλεύκων. Ο όγκος αυτός παρουσιάζει μια ετήσια αύξηση 3,5 mhl (+2%) σε σύγκριση με το 2021. Συνολικά, οι προκαταρκτικές εκτιμήσεις για την παραγωγή οίνου το 2022 στις χώρες της ΕΕ υποδεικνύουν μια αρκετά ετερογενή κατάσταση, λόγω διαφορετικών καιρικών συνθηκών καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, σε διαφορετικές αμπελουργικές περιοχές. Μία από τις χώρες που επλήγησαν περισσότερο από το κύμα καύσωνα τη σεζόν 2022 είναι σίγουρα η Ελλάδα, στην οποία η αναμενόμενη παραγωγή οίνου το 2022 υπολογίζεται σε μόλις 1,7 mhl. Αυτό αντιπροσωπεύει όχι μόνο μια

απότομη πτώση σε σχέση με το προηγούμενο έτος (-29%), αλλά και μια απότομη πτώση σε σύγκριση με το μέσο όρο της πενταετίας (*World Wine Production Outlook OIV First Estimates, n.d.*).



Εικόνα 14: Παραγωγή οίνου στην Ευρωπαϊκή Ένωση για τα έτη 2001 έως 2022 σε mhl. (World Wine Production Outlook OIV First Estimates).

Η παγκόσμια έκταση των αμπελώνων εκτιμάται για το 2021 σε 7,3 mha, οριακά χαμηλότερη σε σύγκριση με το 2020 (-0,3%). 1 mha είναι 1 εκατομμύριο εκτάρια και 1 εκτάριο είναι 10.000 τμ. Η παγκόσμια αμπελοκομική έκταση αναφέρεται στη συνολική επιφάνεια που έχει φυτευτεί με αμπέλια για όλους τους σκοπούς (οίνος και χυμοί, επιτραπέζια σταφύλια και αποξηραμένα σταφύλια) συμπεριλαμβανομένων των νεαρών αμπελιών που δεν είναι ακόμη παραγωγικά. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η επιφάνεια του παγκόσμιου αμπελώνα να έχει σταθεροποιηθεί από το 2017. Η τρέχουσα σταθεροποίηση κρύβει ετερογενείς εξελίξεις σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Συγκεκριμένα, αντίθετες τάσεις παρατηρούνται σε δύο βασικά τμήματα χωρών.



Εικόνα 15: Παγκόσμια mha αμπελώνων (STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).

Παρότι σε ορισμένες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) όπως η Ιταλία και η Γαλλία, όπως και σε Κίνα και Ιράν αυξάνονται οι επιφάνειες των αμπελώνων, στις

μεγάλες αμπελοκαλλιεργητικές χώρες του Νότιου Ημισφαίριου, με εξαίρεση τις Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία, μαζί με τους αμπελώνες των ΗΠΑ, Τουρκία και Μολδαβία παρουσιάζεται σημαντική μείωση στην επιφάνεια του αμπελώνα τους. Αυτές οι αντίθετες τάσεις εξισορροπούν τις επιπτώσεις σε παγκόσμιο επίπεδο. Στην Ελλάδα, οι εκτάσεις έχουν μια μικρή ανοδική τάση από τα 106 kha το 2017 σε 109 kha το 2021. Συνολικά η Ελλάδα κατέχει το 1,5% του παγκόσμιου αμπελώνα (STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).

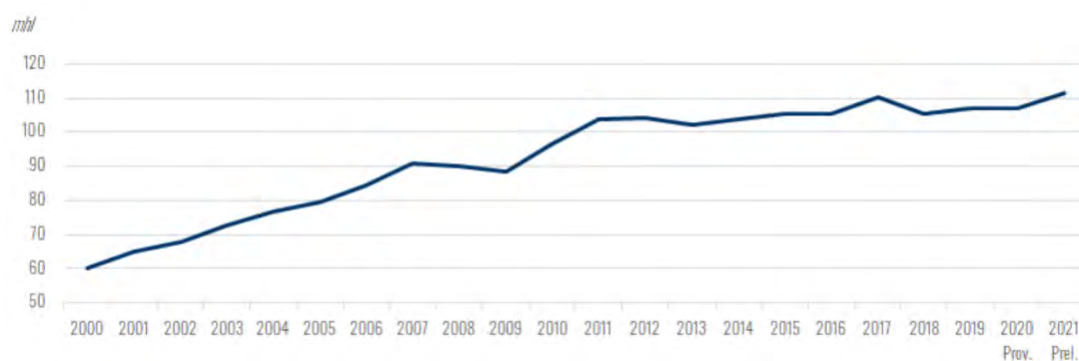
Η παγκόσμια κατανάλωση οίνου για το 2021 υπολογίζεται σε 236 mhl, που ισοδυναμεί με αύξηση 2 mhl (+0,7%) σε σύγκριση με την αντίστοιχη ποσότητα του 2020. Πρόκειται για μια αλλαγή στην αρνητική τάση που ξεκίνησε το 2018 με τη μείωση της κατανάλωσης της Κίνας (η οποία έχει χάσει κατά μέσο όρο 2 mhl ετησίως από τότε). Αυτή η πτωτική τάση εντάθηκε το 2020 από την πανδημία του COVID-19, η οποία έφερε αρνητική επίδραση σε πολλές μεγάλες αγορές οίνου. Η κατανάλωση επλήγει από τα μέτρα lockdown, τη διακοπή του καναλιού HoReCa και τη συνολική έλλειψη του τουρισμού και της διασκέδασης. Το 2021, η άρση των περιορισμών σχετικά με την κυκλοφορία ανθρώπων και αγαθών, το άνοιγμα των καναλιών HoReCa και η αναβίωση των κοινωνικών συγκεντρώσεων και εορτασμών συνέβαλαν, όπως αναμενόταν, στην αύξηση της κατανάλωσης στις περισσότερες χώρες σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, οι συμπεριφορές κατανάλωσης οίνου σε επίπεδο χώρας είναι αρκετά ετερογενείς μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών. Η Ελλάδα είχε μείωση στην



Εικόνα 16: Παγκόσμια κατανάλωση οίνου περιόδου 2000 - 2021 σε mhl (STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).

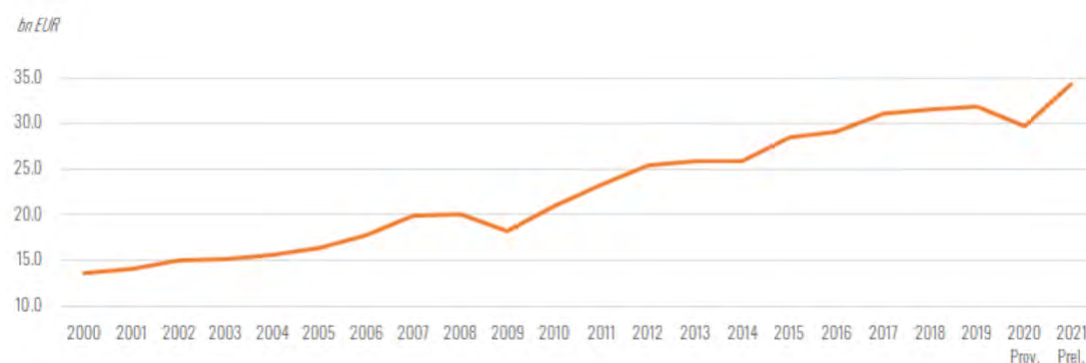
κατανάλωση από 2,4 το 2017 σε 2,2 mhl το 2021 σημειώνοντας πτώση -0,4% σε σχέση με 2017. Η μέση κατανάλωση ανά Έλληνα άνω των 15 ετών είναι 24,6 λίτρα ανά έτος.

Μετά από ένα χρόνο μεγάλων εμπορικών διαταραχών παγκοσμίως, η άρση των περιορισμών λόγω της πανδημίας του COVID-19 έθεσε την παγκόσμια αγορά εξαγωγών οίνου –που θεωρείται εδώ ως το άθροισμα των εξαγωγών όλων των χωρών– σε ανοδική πορεία. Με όγκο 111,6 mhl, το μεγαλύτερο όγκο εξαγωγών που έχει καταγραφεί ποτέ στην ιστορία, οι παγκόσμιες εξαγωγές οίνου το 2021 αυξήθηκαν κατά 4% σε σύγκριση με το 2020 και ενισχύθηκαν ακόμη περισσότερο σε αξία, με 34,3 δισ. ευρώ, σημειώνοντας ετήσια αύξηση κατά 16%. Η εξελισσόμενη δυναμική στο παγκόσμιο εμπόριο οίνου εξακολουθεί να αναπτύσσεται παρά το μεγάλο φάσμα προβλημάτων που αντιμετωπίζει σήμερα το εμπόριο: αύξηση ορισμένων εμπορικών δασμών, επιβράδυνση των θαλάσσιων μεταφορών, διαταραχές της αλυσίδας εφοδιασμού και κρίση τιμών ενέργειας (STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).



Εικόνα 17: Εξέλιξη του διεθνούς εμπορίου οίνου κατ' όγκο (mhl) (STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).

Αντισταθμίζοντας την πτώση που παρατηρήθηκε στην αξία των παγκόσμιων εξαγωγών οίνου κατά το έτος που επηρεάστηκε από το COVID-19 το 2021, η παγκόσμια αξία των εξαγωγών του 2021 έκανε ρεκόρ με 34,3 δισ. ευρώ, 15,5% υψηλότερη από ότι το 2020. Στον αφορά την αξία, η Γαλλία επιβεβαιώνει τη θέση της ως η πρώτη στον κόσμο εξαγωγέας το 2021, με αξία εξαγωγών οίνου αξίας 11,1 δισ. ευρώ. Η Ελλάδα είναι 28^η σε εξαγωγές με συνολικά έσοδα 80 εκατομμύρια ευρώ.



Εικόνα 18: Εξέλιξη του διεθνούς εμπορίου οίνου σε αξία συναλλαγών (bn euro)(STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021, 2022).

1.2.1 Οξειδοαναγωγική ομοιότητα

«Τα ζωντανά συστήματα είναι ανοιχτά συστήματα, που διατηρούνται χάρη στην ανταλλαγή υλικών με το περιβάλλον τους και στη συνεχή δημιουργία και διάσπαση των συστατικών τους», είναι μία φράση που αποδίδεται στον Von Bertalanffy, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως ο πατέρας της γενικής θεωρίας των συστημάτων (Ramage & Shipp, 2020). Η μεταφορά ενέργειας ελέγχεται συστηματικά, με την είσοδο και έξοδο της ενέργειας να βρίσκεται σε ισορροπία (Sies, 2021). Τα έμβια συστήματα για να επιβιώσουν, αναπτυχθούν και αναπαραχθούν επιτελούν διεργασίες αναβολισμού και καταβολισμού, ενώ παράλληλα πραγματοποιούνται μια σειρά από οξειδώσεις και αναγωγές (οξειδοαναγωγές) στα βιομόριά τους. Το επιστημονικό πεδίο της Οξειδοαναγωγικής Βιολογίας ονομάζει την παραπάνω κατάσταση οξειδοαναγωγική ομοιότητα. Η κατάσταση αυτή αποτελεί μία εύθραυστη ισορροπία που χρειάζεται ένα άριστα δομημένο σύστημα που είναι σε θέση να εντοπίζει τροποποιήσεις στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και να ανταποκρίνεται με μηχανισμούς ώστε να επαναφέρει την ισορροπία (le Gal et al., 2021). Το σύστημα αυτό διαδραματίζει καίριο ρόλο στη μεταβολική λειτουργία του κυττάρου και χρησιμοποιεί ένα δίκτυο από ένζυμα, μεταβολίτες, μεταγραφικούς παράγοντες και σηματοδοτικά μονοπάτια έτσι ώστε να διατηρείται η οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων, των συστημάτων, των ιστών και τελικά ολόκληρου του οργανισμού (Wang et al., 2018). Η ρύθμιση της παραπάνω ισορροπίας συμβάλλει, επίσης, σε διεργασίες καθοριστικές για τους οργανισμούς όπως η αυτοφαγία, η γήρανση και η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, καθώς και ο προγραμματισμένος

κυτταρικός θάνατος, οι ανοσολογικές αποκρίσεις και ο μεταβολισμός του κυττάρου (le Gal et al., 2021). Με τους οξειδοαναγωγικούς μηχανισμούς μεταφέρονται ηλεκτρόνια από αναγωγικά μόρια (αντιοξειδωτικά) σε οξειδωτικά (ελεύθερες ρίζες) (Squier, 2001; Tretter et al., 2021). Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων τα αντιοξειδωτικά μόρια (πυρηνόφιλα) οξειδώνονται και μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες (Forman et al., 2014).

Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται ως άτομα ή μόρια που διαθέτουν ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους τους και προσπαθούν να αποκτήσουν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια ώστε να ζευγαρώσουν τα μονήρη ηλεκτρόνια (Lobo et al., 2010). Το οξυγόνο που εμπεριέχεται στα βιολογικά συστήματα είναι ηλεκτρονιόφιλο μόριο και παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Auten & Davis, 2009). Οι ROS είναι οι δραστικές μορφές που έχουν τη μεγαλύτερη σημασία στα βιολογικά συστήματα, καθώς εμπλέκονται στην πρόκληση πολλών παθολογικών καταστάσεων. Άλλες, λιγότερο σημαντικές ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στα βιολογικά συστήματα μετά από αντιδράσεις με τις ROS είναι οι δραστικές μορφές χλωρίου, θείου και αζώτου - Reactive chlorine species (RCS), Reactive sulfur species (RSS), Reactive nitrogen species (RNS)-(Veskoukis et al., 2012).

Η παρουσία των ROS στα βιολογικά συστήματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη βιωσιμότητα των κυττάρων και επομένως των οργανισμών, καθώς οι ίδιες οι δραστικές μορφές δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και ως μεσολαβητές για διάφορες διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ενεργοποίηση μεταγραφικών μονοπατιών και η δράση τους ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Χαρακτηριστική είναι η δράση του νιτρικού οξέος (NO), μιας RNS με έντονη νευροδιαβιβαστική δράση που είναι απαραίτητη στους οργανισμούς για την αγγειοσύσπαση. Εάν το NO συσσωρευθεί στα κύτταρα σε μεγάλες ποσότητες, τότε η δράση του είναι τοξική. Στο παραμένει σε χαμηλά επίπεδα η παρουσία του κρίνεται απαραίτητη. Η κατάσταση αυτή, όπου μια ουσία έχει θετική επίδραση σε ένα οργανισμό σε μικρή δόση και αρνητική σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, είναι γνωστή με τον όρο όρμηση και παρατηρείται σε πολλές καταστάσεις στα βιολογικά συστήματα είτε με ενδογενείς ουσίες είτε με ουσίες και μόρια από το περιβάλλον που έρχονται σε επαφή με τους οργανισμούς (Hanniman & Sinal, 2005; Hofbrucker-Mackenzie et al.,

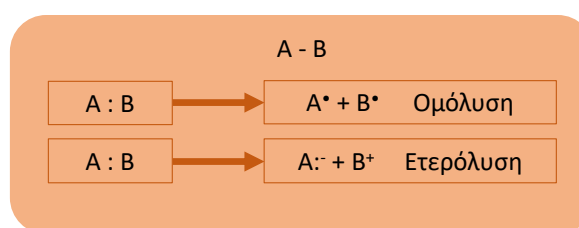
2019; Nita & Grzybowski, 2016; S. D. Ray et al., 2014; Sthijns et al., 2016). Ο Παράκελσος, ο πατέρας της Τοξικολογίας (1493 – 1541) είπε ότι «η δόση μπορεί να κάνει μια ουσία φάρμακο ή δηλητήριο» σκιαγραφώντας το φαινόμενο της όρμησης. Αυτό διατύπωσε και ο Helmut Sies το 2016 ότι «η παρουσία των δραστικών μορφών οξυγόνου σε μικρές συγκεντρώσεις έχει ως αποτέλεσμα το οξειδωτικό ευ-στρες, μια κατάσταση που χρειάζεται για την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση, ενώ μια μεγάλη συγκέντρωση δραστικών μορφών οξυγόνου προκαλεί οξειδωτικό στρες και οδηγεί στην οξειδωτική βλάβη σημαντικών βιομορίων για την εύρυθμη λειτουργία των κυτταρικών συστημάτων με συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο ή ακόμα χειρότερα, παθολογικές καταστάσεις των κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού» (Sies, 2019). Οι ROS μέσα στα κύτταρα οξειδώνουν όλων των ειδών τα βιομόρια, από το DNA μέσα στον πυρήνα μέχρι λιπίδια και πρωτεΐνες, μια κατάσταση που πιστεύεται ότι συμβάλλει στην εμφάνιση γνωστών παθολογικών καταστάσεων, όπως διαταραχές στο νευρικό σύστημα και τη διαβίβαση, διαταραχές που σχετίζονται με τη φλεγμονή, αγγειακές παθήσεις, καρκίνο κ.α. (Nita & Grzybowski, 2016; Yang & Lian, 2020).

Καθώς οι ROS παίζουν σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων, τα κυτταρικά συστήματα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να προστατεύονται από τις οξειδωτικές βλάβες. Για τον σκοπό αυτό τα κύτταρα περιέχουν ενζυμικά και μη ενζυμικά μόρια με αντιοξειδωτική δράση, τα οποία είτε αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες με την παροχή ηλεκτρονίων, είτε μπλοκάρουν τον σχηματισμό τους ή τέλος αποτοξικοποιούν τα κύτταρα από βλάβες και κατεστραμμένα μόρια που δημιουργήθηκαν από τις ROS (A. S. Veskoukis et al., 2012). Άλλες αυτές οι προσπάθειες και οι μηχανισμοί που επιστρατεύονται ελέγχονται από καλά διατηρημένους μοριακούς διακόπτες, που αναγνωρίζουν τα επίπεδα των ROS που υπάρχουν στα κύτταρα, καθώς και τα διαθέσιμα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο σύστημα και ξεκινούν άμεσα την έκφραση γονιδίων για την παραγωγή επιπλέον αντιοξειδωτικών μορίων όπως η γλουταθειόνη ή αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση με σκοπό να αποκριθούν σε ενδεχόμενο στρες. Ένα τέτοιο σύστημα ελέγχου είναι αυτό του Nrf2 / Keap1. Με τον παραπάνω τρόπο οι οξειδοαναγωγικοί μηχανισμοί επαναφέρουν την ισορροπία στα βιολογικά συστήματα (Perdrizet, 1997; Sies, 2019, 2021).

1.2.2 Ελεύθερες ρίζες

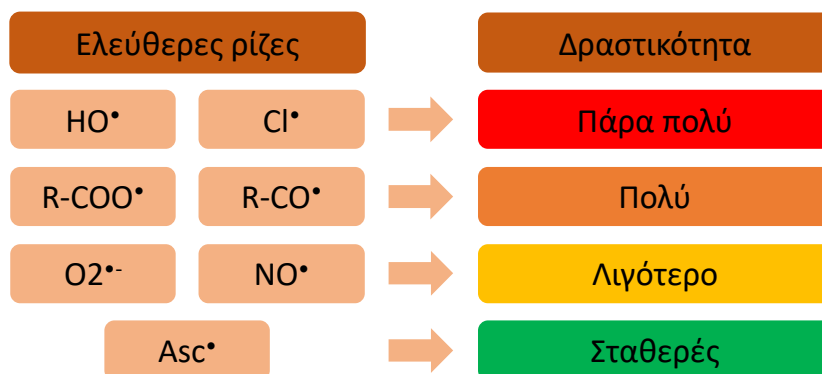
Ο Halliwell το 2007 όρισε την ελεύθερη ρίζα ως «κάθε άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους». Η βιολογική τους σημασία άρχισε να μελετάται σχετικά πρόσφατα με την ανακάλυψη των μηχανισμών που τις συσχετίζουν με παθολογικές καταστάσεις και πρόκληση τοξικότητας (Harwell, 2007). Περαιτέρω έρευνα πάνω στους μηχανισμούς που δρουν οι ελεύθερες ρίζες έδειξε ότι συμμετέχουν ενεργά σε μονοπάτια σηματοδότησης όταν βρίσκονται σε συγκεκριμένα επίπεδα όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Melidou et al., 2005).

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών γίνεται με 2 τρόπους. Ο πρώτος είναι με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και ο δεύτερος με την ομολυτική διάσπαση (με την απορρόφηση ενέργειας είτε με την μορφή θερμότητας είτε με την



Εικόνα 19: Απεικόνιση ομολυτικής και ετερολυτικής διάσπασης ενός ομοιοπολικού δεσμού στην χημική ένωση A-B.

μορφή ακτινοβολίας) ενός ομοιοπολικού δεσμού και το μετέπειτα διαχωρισμό των ηλεκτρονίων του ομοιοπολικού δεσμού που διασπάστηκε (Harwell, 2007). Οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται είναι πολύ δραστικές και προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από μόρια που βρίσκονται γύρω τους με σκοπό να συμπληρώσουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια που έχουν. Κάποιες ελεύθερες ρίζες έχουν μεγαλύτερη ικανότητα στο να αποσπών ηλεκτρόνια σε σχέση με άλλες, λιγότερο δραστικές, ενώ κάποιες άλλες επιλέγουν συγκεκριμένα μόρια-στόχους.



Εικόνα 20. Παραδείγματα ελευθέρων ριζών με διαφορετικές προοξειδωτικές ικανότητες

Το 1894 ο καθηγητής χημείας H.J.H. Fenton (1854 – 1929), ανακάλυψε για πρώτη φορά μία αντίδραση που συμμετέχουν ελεύθερες ρίζες. Αργότερα, ο καθηγητής Χημείας στο πανεπιστήμιο του Μίσιγκαν Moses Gomberg (1866 – 1947) ανακαλύπτει και δημοσιεύει την τριφαινυλο-μεθυλο-ελεύθερη ρίζα (Gomberg, 1900). Τότε ήταν μια ελεύθερη ρίζα επιτίθεται παίρνοντας ένα ηλεκτρόνιο από βιομόρια, αυτά μπορεί να υποστούν ανεπανόρθωτες βλάβες, και στη συνέχεια μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων παράγονται νέες ελεύθερες ρίζες κτλ.

Η παύση αυτού του φαύλου κύκλου είναι δυνατόν να επιτελεστεί με δύο τρόπους. Ο ένας είναι ιδιαίτερα δύσκολο να επιτευχθεί και αφορά ένα πολύ μικρό ποσοστό των αντιδράσεων και πραγματοποιείται με τη δημιουργία ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ 2 ROS με ταυτόχρονη συνεισφορά ενός ηλεκτρονίου από το κάθε ένα. Η άλλη πιθανότητα, που αφορά τις περισσότερες περιπτώσεις που λαμβάνουν χώρα στα ενεργά συστήματα είναι η αντίδραση μιας ROS με ένα μόριο για παράδειγμα X, από το οποίο παίρνει ένα ηλεκτρόνιο και το μετατρέπει σε X[•]. Η ρίζα X[•] δεν είναι όμως δραστική οπότε και σταματάει ο παραπάνω φαύλος κύκλος (Forman et al., 2014; Galaris & Γάλαρης, 2016) .

1.2.3 Δραστικές μορφές

Στα βιολογικά συστήματα υπάρχουν 4 κατηγορίες δραστικών μορφών που σχετίζονται με το κεντρικό άτομο το οποίο περιέχουν. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην κατηγορία των δραστικών μορφών συγκαταλέγονται και μόρια που δεν είναι ρίζες αλλά μπορούν να δράσουν το ίδιο ή και πιο δραστικά σε σχέση με μια ROS, όπως για παράδειγμα το υπεροξειδίο του υδρογόνου (A. S. Veskovikis et al., 2012).

1.2.3.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Το οξυγόνο αποτελεί βασικό στοιχείο για τη ζωή και χρησιμοποιείται από όλους τους ζωντανούς οργανισμούς με εξαίρεση κάποιους μικροοργανισμούς. Η χρήση του όμως έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ROS έστω και εάν υπάρχουν ιδανικές συνθήκες και υποστρώματα για να αποφευχθούν. Έτσι το οξυγόνο παίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στη φυσιολογία, όσο και στη βιοχημεία της αερόβιας ζωής.

Στις ROS συμπεριλαμβάνεται ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα της ατελούς αναγωγής του O₂, ενώ σε αυτές

περιλαμβάνονται και μόρια που δεν είναι ρίζες αλλά έχουν αντίστοιχες φυσικοχημικές ιδιότητες (R et al., 2016; Zhu et al., 2016).

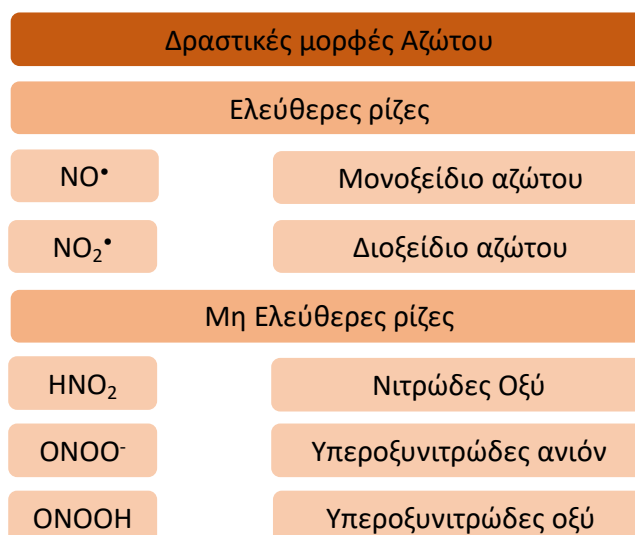
Δραστικές μορφές Οξυγόνου	
Ελεύθερες ρίζες	
$O_2^{\bullet-}$	Ανιόν σουπεροξειδίου
$OH^{\bullet}$	Ρίζα υδροξυλίου
$RO^{\bullet}$	Ρίζα υπεροξειδίου
$ROO^{\bullet}$	Ρίζα υπεροξειδίου
Μη Ελεύθερες ρίζες	
H_2O_2	Υπεροξείδιο υδρογόνου
$ROOH$	Οργανικά υδροπεροξείδια
1O_2	Μονήρες οξυγόνο
O_3	Όζον

Εικόνα 21. Δραστικές μορφές οξυγόνου

Είναι σημαντικό να καταγραφεί ότι το μοριακό οξυγόνο περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια που έχουν ίδια στροφορμή, και ως εκ τούτου αποτελεί μία διπλή ελεύθερη ρίζα. Εάν υπάρξει αλλαγή της στροφορμής και δημιουργηθεί αντιπαράλληλη αυτοπεριστροφή των ηλεκτρονίων τότε το μονήρες οξυγόνο μετατρέπεται σε ιδιαίτερα δραστική μορφή. Τέλος, το οξυγόνο υπάρχει και σε μορφή τριπλής κατάστασης που ωστόσο εμφανίζει ελάχιστη δραστικότητα (Galaris & Γάλαρης, 2016).

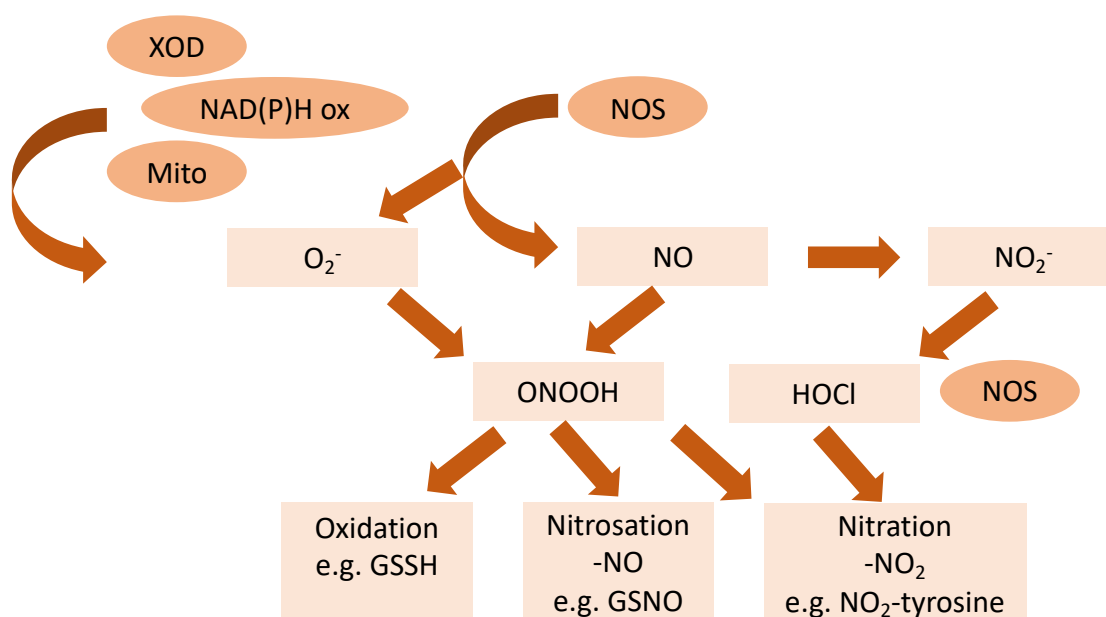
1.2.3.2 Δραστικές μορφές αζώτου

Οι RNS, έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό το μονοξείδιο του αζώτου. Εκτός από το μονοξείδιο και το διοξείδιο του αζώτου στην κατηγορία αυτή ανήκουν και ενώσεις όπως το νιτρώδες οξύ (Giles et al., 2001, 2017).



Εικόνα 22. Δραστικές μορφές αζώτου

Το NO[•] που περιλαμβάνεται στην κατηγορία των RNS είναι αρκετά αδρανές μόριο και έχει δράση ανάλογη του O₂. Ως μόριο το NO[•] είναι υδρόφοβο, χωρίς φορτίο και μικρό, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που του επιτρέπουν να διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες των κυττάρων και να παίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση των κυττάρων. Ωστόσο, η σύνδεσή του με το ανιόν σουπεροξειδίου έχει ως παράγωγο το σχηματισμό περοξυνιτρίτη, ο οποίος έχει τοξική επίδραση στα βιομόρια, καθώς προκαλεί οξειδώσεις, νιτροσυλίωση, νίτρωση και νιτροποίηση (Patel et al., 2017).



Εικόνα 23. NO-εξαρτώμενες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών μορφών αζώτου.

1.2.3.3 Δραστικές μορφές θείου και χλωρίου

Στις RSS συγκαταλέγονται ενώσεις που διαθέτουν άτομα θείου σε υψηλό βαθμό οξειδωσης. Γενικά το θείο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση, καθώς είναι στοιχείο πολλών ενώσεων που αποτελούν μέρος των μεταβολικών οδών. Επιπλέον, είναι παρόν σε αμινοξέα, όπως η μεθειονίνη και η κυστεΐνη, ενώ υπάρχει και στο σημαντικότερο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μόριο, τη γλουταθειόνη. Τέλος αποτελεί το κλειδί για τη φυσιολογική λειτουργία πολλών ενζύμων με χαρακτηριστικό παράδειγμα την καταλάση (Giles et al., 2017; Gruhlke & Slusarenko, 2012; Iciek et al., 2016).

Οι RCS είναι ενώσεις που περιέχουν χλώριο στη δομή τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το υποχλωριώδες οξύ, το οποίο παρουσιάζει έντονη δράση αλληλεπιδρώντας με ομάδες θείου, τις οποίες οξειδώνουν και δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς με πρωτεΐνες καταλήγοντας στην παραγωγή συσσωματωμάτων. Τέλος η ικανότητα των RCS να χλωριώνουν νουκλεοτίδια έχει πολύ επικίνδυνες συνέπειες για το DNA, όπως επίσης και η χλωρίωση αμινικών ομάδων πεπτιδίων και πρωτεϊνών που οδηγεί σε σχηματισμό χλωραμινών (Zhu et al., 2016).

Δραστικές μορφές	
Θείου	
RSSR	Δισουλφίδιο
RSOH	Σουλφενικό οξύ
RSO ₂ H	Σουλφινικό οξύ
RS•	Ρίζα θειωλίου
Χλωρίου	
HClO	Υποχλωριώδες Οξύ
OCI ⁻	Υποχλωριώδες ανιόν
RNHCl	Χλωραμίνες

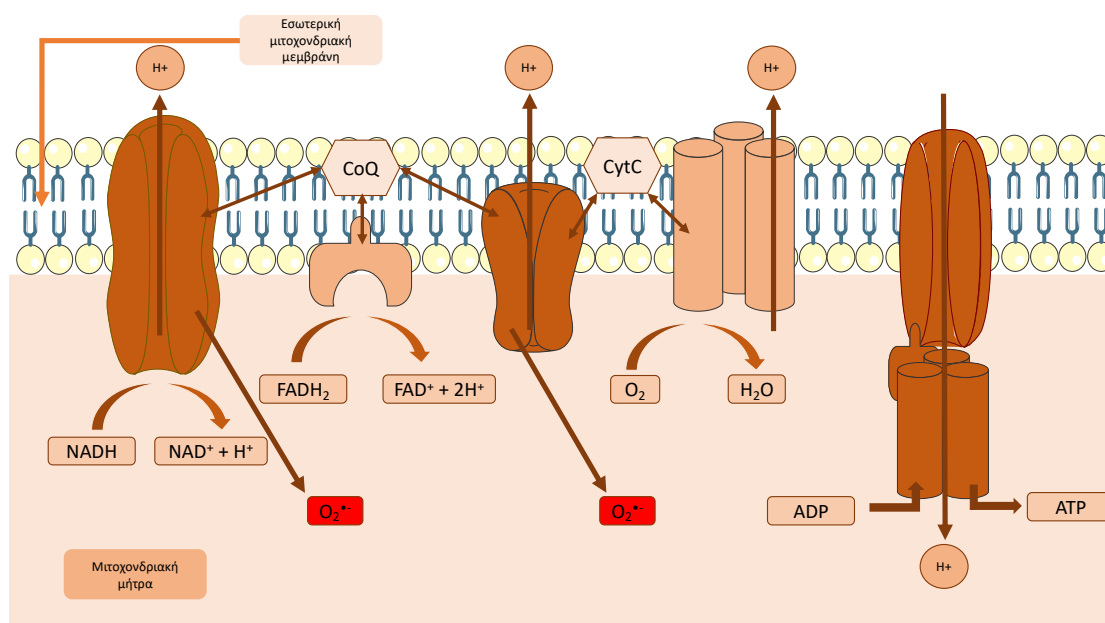
Εικόνα 24. Δραστικές μορφές θείου και χλωρίου.

1.2.4 Σχηματισμός ROS σε οργανισμούς

Φυσιολογικά στα βιολογικά συστήματα παράγονται διαρκώς τόσο ROS αλλά και άλλες δραστικές μορφές από διαδικασίες του μεταβολισμού αλλά και της αλληλεπίδρασης του οργανισμού με το περιβάλλον. Δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται τόσο μη ενζυμικά από αυθόρμητες αντιδράσεις του οξυγόνου με οργανικές ενώσεις αλλά και ενζυμικά όπως για παράδειγμα οι αντιδράσεις που γίνονται στο κυτόχρωμα P-450, η αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας κ.α. (Lobo et al., 2010).

1.2.4.1 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Μια διαδικασία του μεταβολισμού που ευθύνεται για σημαντική παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια και παράγει το μεγαλύτερο ποσοστό (περίπου 70%) της ενέργειας που χρειάζεται ένας αερόβιος οργανισμός με τη μορφή του ενεργειακού νομίσματος ATP. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μετακίνηση ηλεκτρονίων στο O_2 με σκοπό να σχηματιστεί νερό (H_2O). Στη αλυσίδα αντιδράσεων που πραγματοποιείται παίρνουν μέρος μια σειρά από μόρια όπως το σύμπλοκο NADH δεϋδρογονάσης του συνένζυμου Q (I), το συνένζυμο Q, το σύμπλοκο αναγωγάσης του κυτοχρώματος c (II), το κυτόχρωμα c και το σύμπλοκο οξειδάσης του κυτοχρώματος c (III). Αρχικά, τα ηλεκτρόνια προέρχονται από το NADH και το $FADH_2$ και είναι προϊόντα γλυκόλυσης αλλά και του κύκλου του κιτρικού οξέος, διαθέτουν ένα ζεύγος ηλεκτρονίων που μπορούν να μεταφέρουν εύκολα σε άλλα μόρια, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπου τα 2 αυτά μόρια οξειδώνονται μεταφέροντας τα ηλεκτρόνιά τους. Χωρίς να είναι γνωστός ο λόγος, ένα ποσοστό της τάξης του 2% από τα παραπάνω ηλεκτρόνια, διαφεύγει της διαδικασίας και συνδέεται στο οξυγόνο παράγοντας O_2^- ή / και H_2O_2 ενώ τα 2 αυτά μόρια μέσω μιας σειράς αντιδράσεων παράγουν $OH^\cdot$ (Cadenas, 2018; Cheng et al., 2017; Sousa et al., 2018; R. Z. Zhao et al., 2019; Παπαγαλάνης & Papagalanis, 2015).

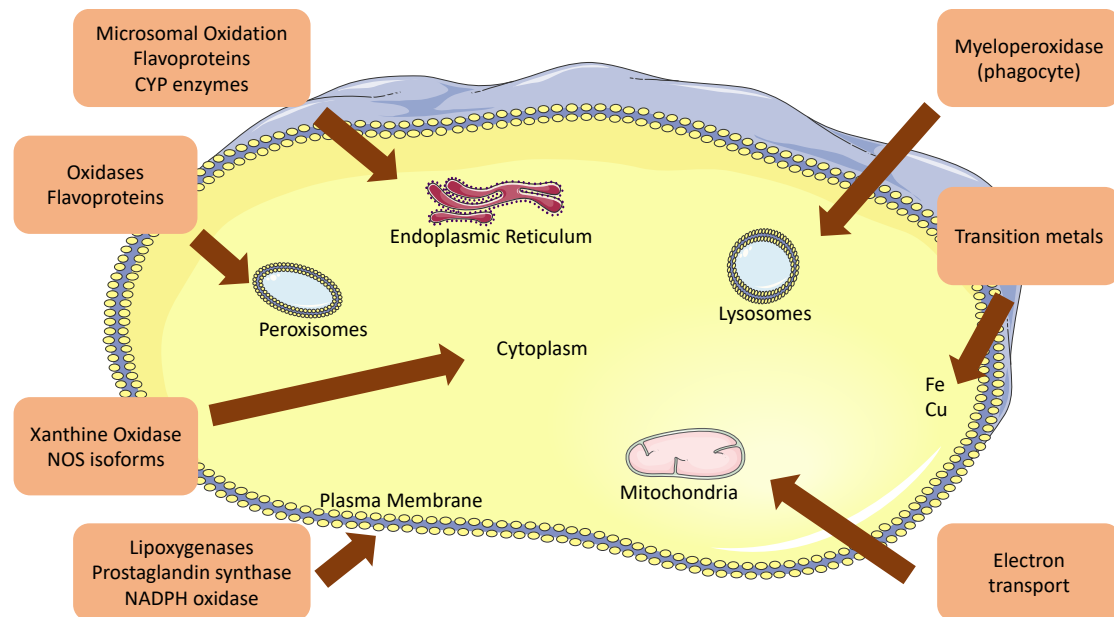


Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση της παραγωγής ROS κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Το O₂ που εισέρχεται στην κυκλοφορία ενός οργανισμού και δε φτάνει στα μιτοχόνδρια για την παραγωγή ενέργειας, αποτελεί περίπου το 5% του συνολικού οξυγόνου που εισέρχεται σε έναν οργανισμό και λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα ενζυμικά συστήματα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. NADH-οξειδάση, οξειδάση του CYP-P450, κυκλοξυγενάση, λιποξυγενάση και ξανθινοξειδάση είναι ένζυμα που σταδιακά μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι κατά σειρά παραγωγής τους, το ανιόν σουπεροξειδίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το υδροξύλιο (Auten & Davis, 2009; Djordjevic et al., 2008; Dröge, 2002; Valko et al., 2007; Παπαγαλάνης & Papagalanis, 2015). Επιπλέον, κάποια ιόντα μετάλλων όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, το χρώμιο, το κοβάλτιο, το αρσενικό, το κάδμιο και το νικέλιο είναι ενζυμικοί συμπαράγοντες και όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή αντιδρούν με το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγοντας υδροξύλιο μέσα σε βιολογικά συστήματα οπότε είναι και αυτά σε θέση να προκαλέσουν καταστροφή σε ευπαθή μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, τα λίπη και το DNA (Barrera, 2012; Leonard et al., 2004; X. Shi et al., 1994). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το χρώμιο το οποίο όταν βρει κυστεΐνες ή πενικιλλαμίνες παράγειθειολικές ρίζες που είτε δρουν απευθείας προκαλώντας βλάβες σε βιομόρια ή αντιδρούν με άλλεςθειόλες και παράγουν ανιόν σουπεροξειδίου (Leonard et al., 2004; X. Shi et al., 1994).

Τέλος, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να προκαλέσει δημιουργία ROS. Πιο αναλυτικά, ορσιμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να καταπολεμούν εξωγενείς παράγοντες όπως βακτήρια αλλά και μεταμοσχευμένα όργανα. Κυρίαρχο ρόλο παίζουν τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, καθώς φαίνεται να έχουν αυξημένο μεταβολισμό που συνοδεύεται από μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών (de la Fuente, 2002; Valko et al., 2006; Victor et al., 2004). Τα φαγοκύτταρα ενεργοποιούνται από την είσοδο των παθογόνων στον οργανισμό και συγκεκριμένα από τη σύνδεση αντιγόνων στους μεμβρανικούς υποδοχείς τους. Με την σύνδεση αυτή ενεργοποιείται η κατά τα άλλα αδρανής NADPH οξειδάσης 2, η οποία παράγει O_2^- (Magnani & Mattevi, 2019). Με την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων από τη σύνδεση τους με τα αντιγόνα, η κατανάλωση οξυγόνου γίνεται με ρυθμό έως και 100 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με την κατάσταση ηρεμίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό O_2^- με τον αντίστοιχο ρυθμό (Babior, 2000). Η υπερπαραγωγή του ανιόντος αυτού έχει ως αποτέλεσμα την κατάλυσή του από τη SOD, με ταυτόχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο καταλήγει στο σχηματισμό υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton (Lawrenz et al., 2017). Τόσο το ανιόν του σουπεροξειδίου όσο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι ισχυρά οξειδωτικά, έτσι δεν έχουν την δυνατότητα να εξουδετερώσουν από μόνα τους τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Για να γίνει αποτελεσματικά η καταπολέμησή τους, από τα φαγοκύτταρα εκκρίνονται κυστίδια που φέρουν μια αιμοπρωτεΐνη, το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση (MPO), το οποίο με υπόστρωμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου, και ουδέτερο ή χαμηλό pH, παράγει υποχλωριώδες οξύ με την οξείδωση ιόντων χλωρίου (Hampton et al., 1998; Nauseef, 2014; Winterbourn et al., 2006).

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι μονομεμβρανικά οργανίδια που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αλλά και την εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών (Bonekamp et al., 2009). Περιέχουν διάφορα ένζυμα όπως οξειδάσες με σκοπό την διάσπαση διαφόρων υποστρωμάτων όπως πουρίνες, λιπαρά οξέα και άλλα μόρια προς παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Angermüller et al., 2009; Čapek & Roušar, 2021; del Río et al., 1992). Τέλος στα υπεροξειδιοσώματα ή όπως χαρακτηρίζονταν παλαιότερα μικροσωμάτια, υπάρχει η καταλάση, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Costello et al., 2018; Fransen et al., 2017; Lismont et al., 2019; Nordgren & Fransen, 2014; Schrader et al., 2015).



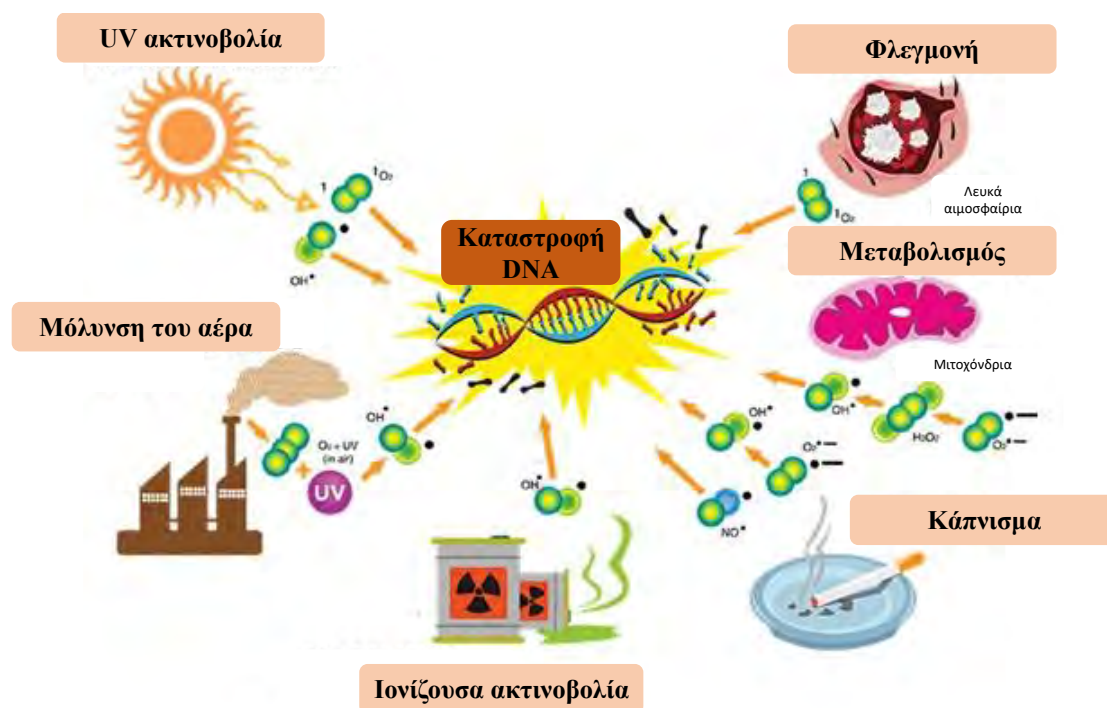
Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση της ενδογενούς παραγωγής ROS.

1.2.4.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Εκτός από τους ενδογενείς παράγοντες που προκαλούν παραγωγή ελευθέρων ριζών, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες όπως το άγχος, η κατανάλωση λιπαρών και καπνισμένων τροφών, καθώς και η επαναχρησιμοποίηση ελαίων αλλά και γενικότερα ο τρόπος διαβίωσης ενός οργανισμού (Ames, 1982, 1983, 1984; Phaniendra et al., 2015).

Άλλος σημαντικός παράγοντας σχηματισμού ελευθέρων ριζών είναι η ακτινοβολία. Είτε είναι ιονίζουσα ή υπεριώδης, ευθύνεται για την παραγωγή ROS. Επιπλέον, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι από τις μηχανές εσωτερικής καύσης, τα απόβλητα των βιομηχανιών και ο καπνός του τσιγάρου προκαλούν παραγωγή των ROS στα διάφορα βιολογικά συστήματα (Koren, 1995).

Τέλος, ένας επιπλέον παράγοντας παραγωγής ROS σχετίζεται με τη λήψη φαρμάκων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η αζιδοθυμιδίνη και η δοξορουβικίνη. Η πρώτη προκαλεί δυσλειτουργία στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα μεγαλύτερη διαφυγή ηλεκτρονίων και παραγωγή ROS, ενώ η δεύτερη κατά το μεταβολισμό της οδηγεί στη δημιουργία οξειδωτικών ενδιάμεσων (Deavall et al., 2012).

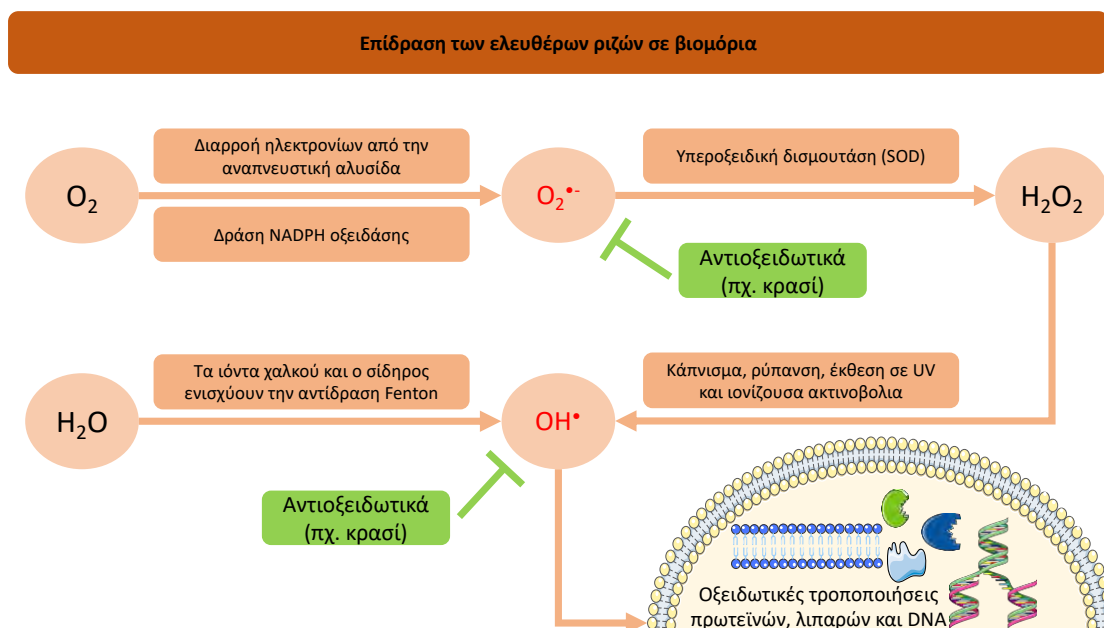


Εικόνα 27. Εξωγενείς παράγοντες παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.2.5 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών

1.2.5.1 Αρνητικές επιδράσεις - Μοριακοί μηχανισμοί πρόκλησης βλαβών σε δομικά κυτταρικά συστατικά

πως αναφέρθηκε και στο πεδίο της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (1.2.1), η ύπαρξη ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι θεμιτή μέχρι ένα κρίσιμο σημείο. Ωστόσο, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων τόσο σε δομικό όσο και λειτουργικό επίπεδο που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο ή άλλες παθολογικές καταστάσεις (Gomez-Cabrera et al., 2008; Viña et al., 2000; Vinña et al., 2000). Οι αλληλεπιδράσεις με τα βιομόρια των κυττάρων όπως με το γενετικό υλικό, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια προκαλούν δομικές αλλαγές που τα καθιστούν μη λειτουργικά (Halliwell, 2005, 2015).



Εικόνα 28.: Επίδραση ROS σε βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια).

1.2.5.1.1 Επιδράσεις στα νουκλεϊκά οξέα

Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται τόσο στο DNA όσο και στο RNA προκαλώντας σοβαρά προβλήματα. Η βλάβη που προκαλείται στο RNA είναι πιο συνηθισμένη, καθώς είναι μονόκλωνο και ταξιδεύει και στο κυτταρόπλασμα σε αντίθεση με το δίκλωνο DNA που βρίσκεται υπερελικωμένο στον πυρήνα. Η πιθανή τροποποίηση του τελευταίου από ελεύθερες ρίζες δημιουργεί πολύ πιο σημαντικά προβλήματα. Τέλος, το μιτοχondριακό DNA είναι πολύ πιο πιθανό να υποστεί τροποποιήσεις, καθώς στο οργανίδιο αυτό παράγονται ROS στο μεγαλύτερο ποσοστό (Phaniendra et al., 2015).

Η κύρια ρίζα που προκαλεί τις βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα είναι η ρίζα υδροξυλίου η οποία μπορεί να προκαλέσει θραυσμάτωση του RNA και μονόκλωνα ή και δίκλωνα θραύσματα του DNA. Επιπλέον, προβλήματα μπορεί να δημιουργήσει με την τροποποίηση των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων με τις θυμίνη και κυτοσίνη να είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στη βλάβη από ελεύθερες ρίζες (Mortenson et al., 2018; Rudling et al., 2017). Τέλος, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά και τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την επιδιόρθωση όλων των παραπάνω βλαβών.

Λες οι παραπάνω καταστάσεις επηρεάζουν άμεσα τη σωστή λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων με πρόκληση μεταλλάξεων κάτι που μπορεί υπό συνθήκες να

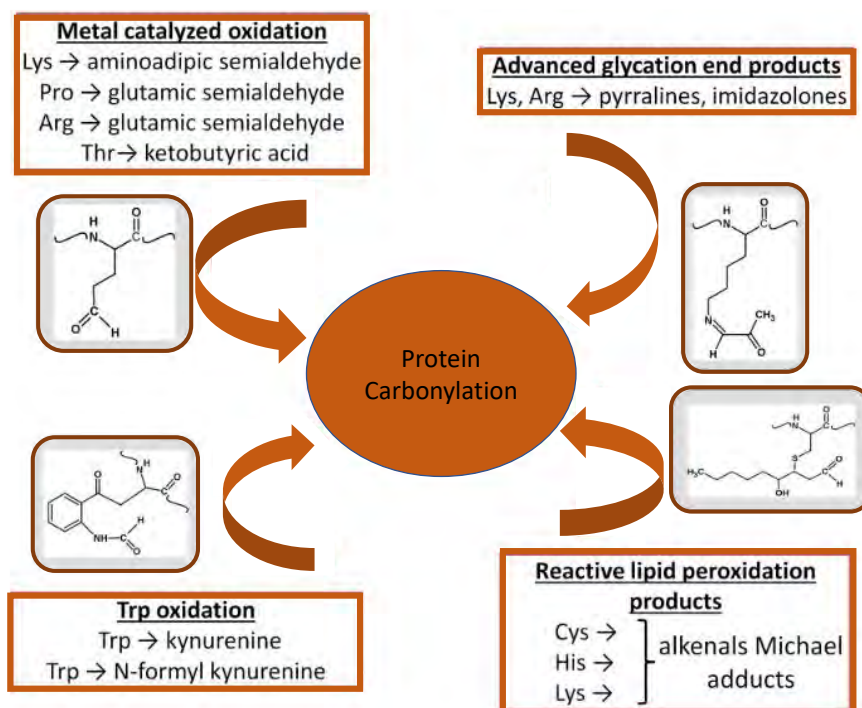
οδηγήσει σε κληρονομικές ασθένειες και καρκινογένεση (Collin, 2019; Juan et al., 2021; Magnani & Mattevi, 2019; Mailloux, 2020; Sies & Jones, 2020).

1.2.5.1.2 Επιδράσεις στις πρωτεΐνες

Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται οξειδώνοντας αμινοξέα και κατ' επέκταση πρωτεΐνες. Με την οξείδωση των αμινοξέων μπορεί να πραγματοποιηθεί αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου με αποτέλεσμα την υπερδραστηριότητα ή την καταστροφή του. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με πρωτεΐνες που παίζουν λειτουργικό ή δομικό ρόλο, οι οποίες μπορεί να χάσουν την δυνατότητα μεταφοράς εάν είναι υποδοχείς ή φορείς (Butterfield et al., 1998).

Τα πλέον ευπαθή αμινοξέα είναι η κυστεΐνη, η αργινίνη, η θρεονίνη, η λυσίνη, καθώς και η προλίνη. Οι θειολικές μονάδες της κυστεΐνης οξειδώνονται σε ρίζες του θείου, ενώ τα υπόλοιπα αμινοξέα μετατρέπονται σε καρβονυλομάδες οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό δραστικών ριζών ή/και δισουλφιδικών δεσμών (Mayo et al., 2003; Salvi et al., 2001). Τέλος, η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών που παρατηρείται είναι ένας δείκτης που επιτρέπει τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες και τον έλεγχο της καταστροφής που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες (R. Levine et al., 2000; R. L. Levine et al., 1999; Stadtman et al., 2003).

Μια λύση των κυττάρων ενάντια στις ελαττωματικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα, που προκύπτουν μετά την τροποποίησή τους από ελεύθερες ρίζες, θα ήταν η ουβικιτινιλίωσή τους και η αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα ή η υδρόλυσή τους. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την αποφυγή της μετακίνησής τους στα κύτταρα και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα μόρια και πρωτεΐνες και συσώρευσή τους. Ωστόσο, αυτή η επιλογή δεν μπορεί να ακολουθηθεί από τα κύτταρα, καθώς και τα 2 μονοπάτια αποικοδόμησής τους προσβάλλονται από τις ελεύθερες ρίζες και δυσλειτουργούν (Friguet, 2002; Friguet et al., 2000; Shringarpure & Davies, 2002; Szveda et al., 2002, 2003).



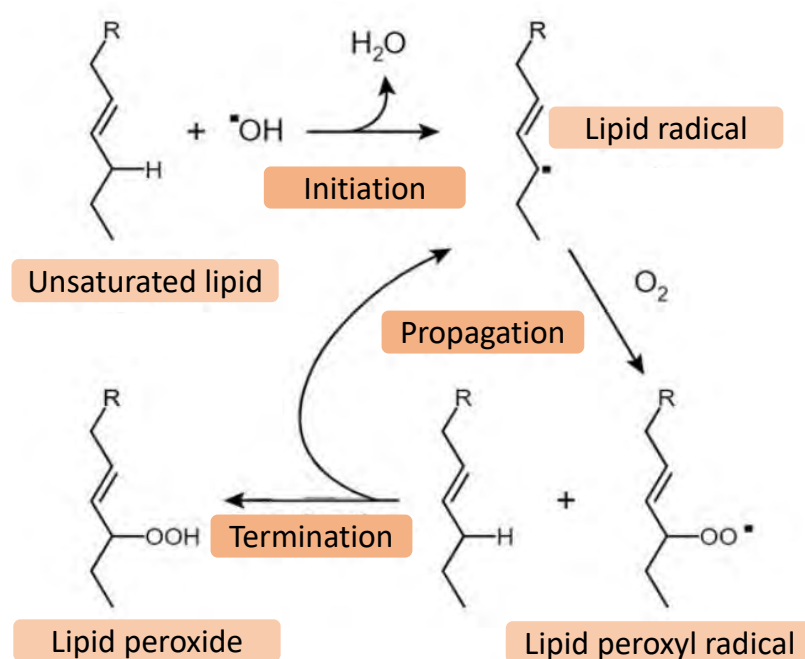
Εικόνα 29. Κύρια μονοπάτια σχηματισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων, (i) μέσω οξείδωσης καταλυόμενης από μέταλλο στις πλευρικές αλυσίδες Lys, Pro, Arg και Thr, (ii) με απευθείας οξείδωση σε Trp, (iii) ως προϊόντα προσθήκης προηγμένων προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs) σε Lys και Arg. και (iv) αντίδρασης προϊόντων υπεροξείδωσης λιπιδίων με Cys, His και Lys (Fedorova, Bollineni and Hoffmann, 2014).

1.2.5.1.3 Επιδράσεις στα λιπίδια

Εκτός από τα νουκλεϊκά οξέα και τις πρωτεΐνες, οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν και τα λιπίδια. Κύριος στόχος είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία είναι λιπίδια με διπλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Η λιπιδική υπεροξείδωση είναι ένας δείκτης της καταστροφής που έχουν υποστεί τα λιπίδια και ερευνάται ιδιαίτερα, καθώς έχει πολύ μεγάλη βιολογική σημασία για την ανθρώπινη υγεία και νόσο, καθώς μπορεί να επιφέρει την απώλεια λειτουργίας της πλασματικής μεμβράνης (μείωση της ρευστότητας, αύξηση διαπερατότητας σε Ca^{2+} και H^+) (Ayala et al., 2014; Margină, Ungurianu, Purdel, Nițulescu, et al., 2020a; Phaniendra et al., 2015; Valko et al., 2007). Οι ROS που προσβάλλουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αφήνουν χωρίς υδρογόνο το μεθυλένιο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ελεύθερης λιπιδικής ρίζας ($\text{L}\cdot$) κατά τη φάση της έναρξης. Η ρίζα αυτή είναι ιδιαίτερα ασταθής και παίρνει ηλεκτρόνια από άλλα μόρια δημιουργώντας μία πιο σταθερή ρίζα που πλέον μπορεί να αντιδράσει με το οξυγόνο και να σχηματίσει μια ρίζα λιπιδικού υπεροξειδίου ($\text{LOO}\cdot$). Η $\text{LOO}\cdot$ θα δημιουργήσει νέες ρίζες κατά τη φάση αυτή που

ονοματίζεται ως φάση διάδοσης, δημιουργώντας και τροφοδοτώντας έναν φαύλο κύκλο που σταματάει μόνο όταν σχηματιστεί κάποιο αδρανές προϊόν κατά τη φάση λήξης του κύκλου (Juan et al., 2021; Yin et al., 2011).

Εκτός των παραπάνω, όταν προκαλείται λιπιδική υπεροξείδωση πολλές φορές προκύπτουν και άλλα παραπροϊόντα όπως η 4-υδροξυεπενάλη (4-HNE), καθώς και μαλονδιαλδεΐδη (MDA), που θεωρούνται ιδιαίτερα τοξικές και μεταλλαξιογόνες ουσίες της υπεροξείδωσης (Eckl & Bresgen, 2017; Esterbauer et al., 1990; Mondal et al., 2022).



Εικόνα 30. Αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξείδωσης.

1.2.5.2 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες όταν υπάρχουν σε υψηλά επίπεδα στα βιολογικά συστήματα είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τους οργανισμούς. Ωστόσο, κάτω από ένα κρίσιμο επίπεδο, το οποίο δεν είναι γνωστό πιο ακριβώς είναι ή από τι εξαρτάται, οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητες και παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλά και κρίσιμα συστήματα (Margaritelis et al., 2016; Skaperda, Tekos, Vardakas, et al., 2021; A. S. Veskoukis et al., 2021; A. S. Veskoukis, Tsatsakis, et al., 2020). Πολύ σημαντική είναι η επίδραση των ROS στην εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπου παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την φαγοκυττάρωση (Pizzino et al., 2017). Ακόμα έχουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση τόσο μέσα στο ίδιο το κύτταρο αλλά και στη διακυτταρική επικοινωνία. Επιπλέον, διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στον

κυτταρικό κύκλο, καθώς σχετίζονται με λειτουργίες που έχουν να κάνουν με το μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο (Apel & Hirt, 2004; Choudhury et al., 2017; Mittler, 2017). Τέλος είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB και ο Nrf2 και στη σηματοδότηση των φωσφατασών τυροσίνης και MAP κινασών (Chakraborti & Chakraborti, 1998; Kamata & Hirata, 1999; Patel et al., 2017; Ueda et al., 2002).

1.2.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

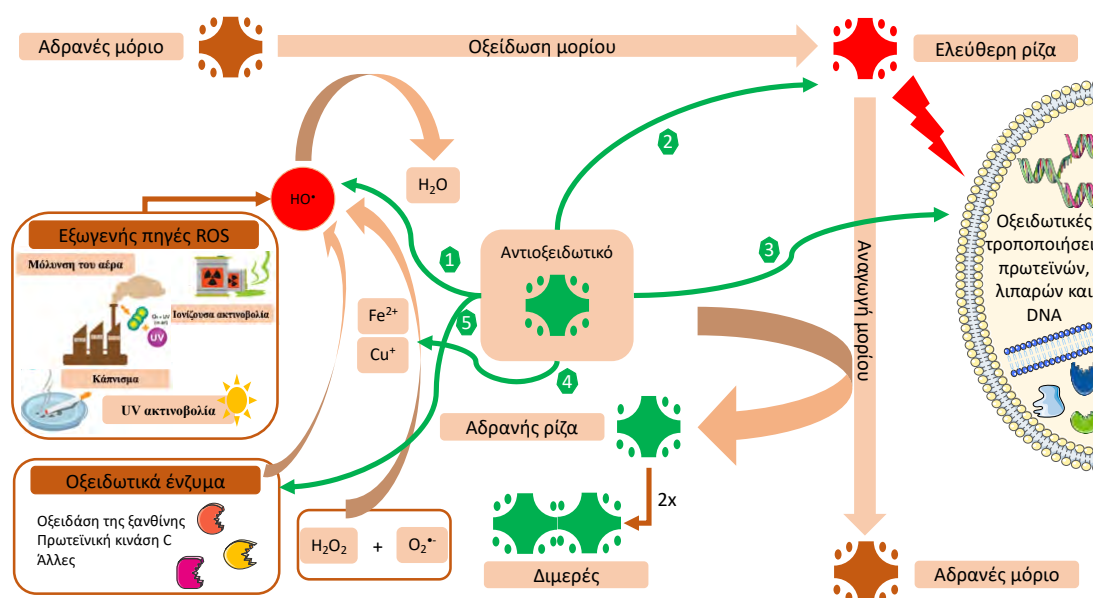
Τα κύτταρα στην προσπάθειά τους να καταπολεμήσουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται αυθόρμητα σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες του μεταβολισμού του κυττάρου ανέπτυξαν μηχανισμούς για να προστατευτούν από αυτές και να διατηρήσουν την ομοιοστασή τους.

Τα αντιοξειδωτικά ορίζονται σύμφωνα με τον Barry Halliwell, καθηγητή Βιοχημείας, με ειδίκευση στον μεταβολισμό των ελεύθερων ριζών ως «οποιαδήποτε ουσία, η παρουσία της οποίας σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, μπορεί να καθυστερήσει, να αναστείλει ή να απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο στόχο» (Halliwell & Gutteridge, 2015). Για να χαρακτηριστεί όμως μια ουσία ως αντιοξειδωτικό είναι σημαντικό να είναι γνωστός ο τρόπος δράσης της, καθώς και η απαιτούμενη συγκέντρωση (A. S. Veskovikis et al., 2012).

Ο ίδιος καθηγητής παλαιότερα είχε περιγράψει τα αντιοξειδωτικά ως «κάθε ουσία που δύναται να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες ή άμεσα αντιδρώντας με αυτές ή έμμεσα εμποδίζοντας την παραγωγή δραστικών ειδών ή/και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική άμυνα» (Halliwell, 1996). Πιο αναλυτικά, η δράση των αντιοξειδωτικών μπορεί να ταξινομηθεί σε 5 μεγάλες κατηγορίες (de Oliveira Silva & Batista, 2017):

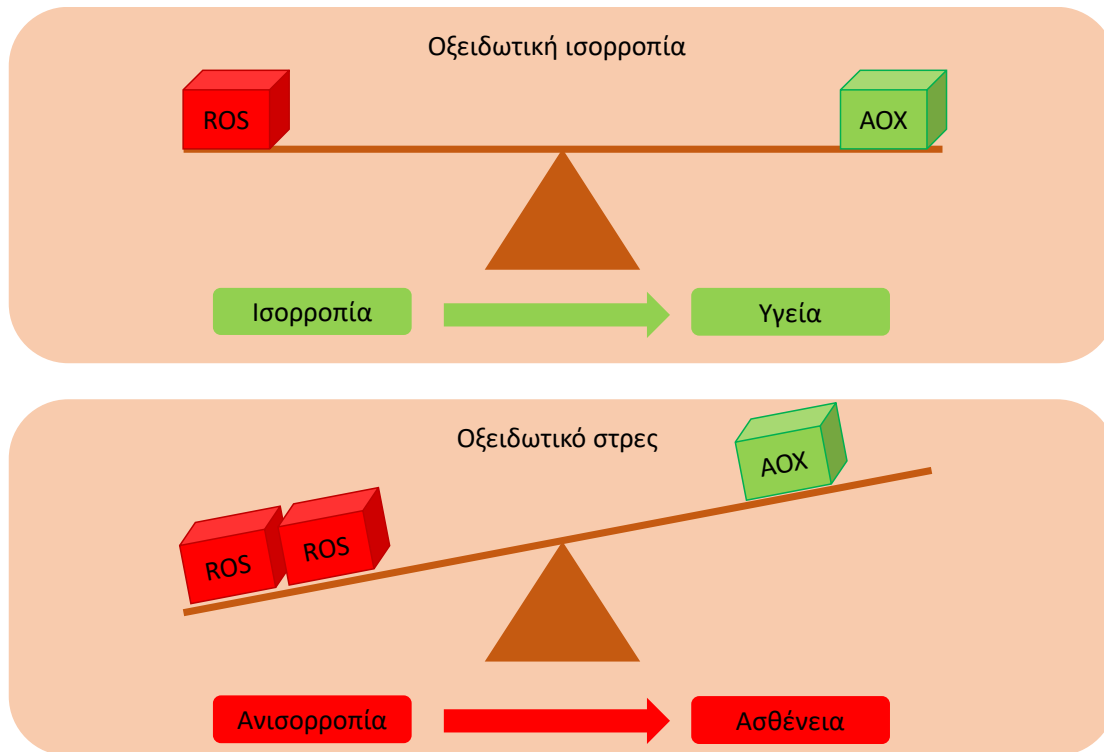
- I. Άμεση εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών ως δότες ηλεκτρονίων, διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις παραγωγής οξειδωτικών μορίων.
- II. Ανάκτηση σταθερών μορίων με τη δωρεά ατόμων υδρογόνου, μετατρέποντας τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά προϊόντα.

- III. Αναστολή δράσης οξειδωτικών ενζύμων, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, μειώνοντας την παραγωγή δραστικών μορφών.
- IV. Περιορισμός της διαθεσιμότητας χηλικών μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου και χαλκού), τα οποία λειτουργούν ως προ-οξειδωτικά και μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss οδηγούν στο σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ριζών.
- V. Επιδιόρθωση οξειδωτικών βλαβών σε σημαντικά βιομόρια (μεμβρανικά λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA).



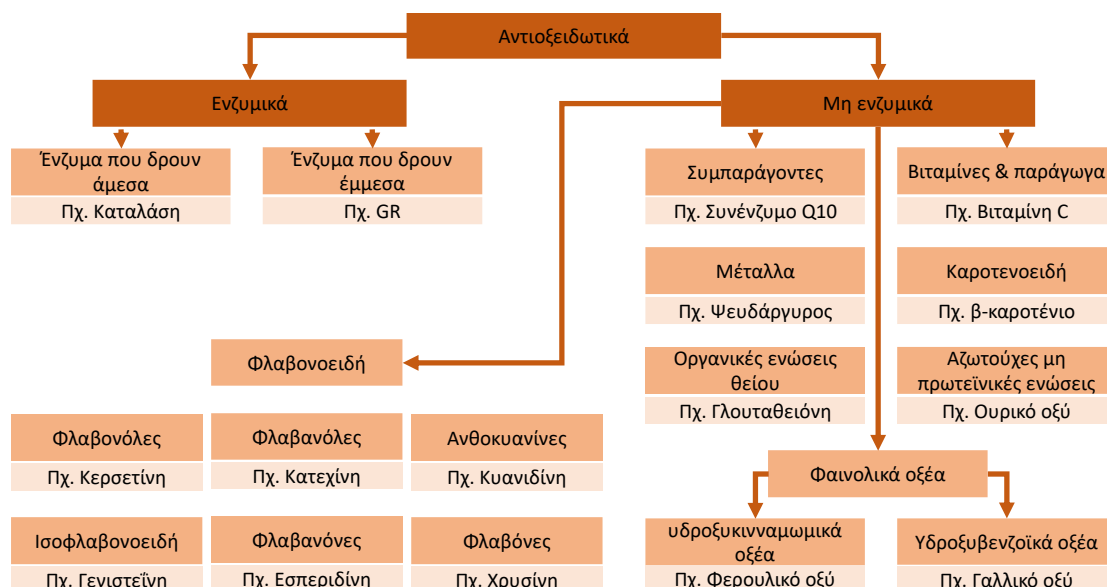
Εικόνα 31. Μηχανισμός δράσης αντιοξειδωτικών.

Οι μοριακοί μηχανισμοί των κυττάρων που ελέγχουν τη δράση των αντιοξειδωτικών είναι πολύ σημαντικό να είναι καλά διατηρημένοι, καθώς είναι αδήριτη ανάγκη να εξουδετερώνονται μόνο οι πλεονάζουσες ελεύθερες ρίζες, καθώς όπως αναφέρθηκε παραπάνω μία σταθερή συγκέντρωση είναι απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων και της σηματοδότησης. Το ποια είναι η κατάλληλη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών και αντίστοιχα των αντιοξειδωτικών, είναι κάτι που προς το παρόν γνωρίζουν μόνο τα ίδια τα κύτταρα, ενώ οι ερευνητές προσπαθούν να ανακαλύψουν.



Εικόνα 32. Οξειδοαναγωγική ομοιόσταση.

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν σε 3 μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη τα διακρίνει σχετικά με την προέλευσή τους στα ενδογενή, αυτά που παράγονται στον ίδιο τον οργανισμό, και στα εξωγενή, αυτά που λαμβάνει ο οργανισμός από άλλες πηγές. Η δεύτερη κατηγορία τα διαχωρίζει με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες σε υδρόφιλα και λιπόφιλα, ενώ τέλος η τρίτη κατηγορία τα κατηγοριοποιεί με βάση τη βιολογική τους δράση σε ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.



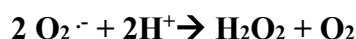
Εικόνα 33: Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών.

1.2.6.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Τα ενζυμικά συστήματα διαχωρίζονται σε 2 πυλώνες. Ο πρώτος περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία δρουν απευθείας στις ROS εξουδετερώνοντάς τις, ενώ ο δεύτερος διαθέτει ένζυμα τα οποία χρειάζονται τα ενδογενή αντιοξειδωτικά για να δράσουν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες (Sharifi-Rad et al., 2020).

1.2.6.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση

Η SOD είναι ένα μεταλλοένζυμο το οποίο είναι επιφορτισμένο με τη σημαντική για την υγεία του κυττάρου μετατροπή του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , δηλαδή τη μετατροπή ενός ιδιαίτερα δραστικού οξειδωτικού σε ένα πολύ πιο ήπιο. Η αντίδραση που καταλύει παρουσιάζεται στη συνέχεια (Ighodaro & Akinloye, 2018):



Αξίζει να σημειωθεί πως στα θηλαστικά η SOD υπάρχει ως 3 ισομορφές, οι οποίες διαφοροποιούνται με βάση το μέταλλο που διαθέτουν στο ενεργό τους κέντρο, ενώ εντοπίζονται και σε διαφορετικά σημεία του κυττάρου. Η ισομορφή που έχει μεγαλύτερο φόρτο εργασίας λόγω θέσης, είναι η Mn-SOD η οποία βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, ακολουθεί η Cu-SOD που συναντάται στο κυτταρόπλασμα και τέλος η CuZn-SOD, η οποία απαντάται στο εξωκυττάριο υγρό.

1.2.6.1.2 Καταλάση

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του H_2O_2 σε αδρανή μόρια, όπως φαίνεται παρακάτω:



Είναι το σημαντικότερο ενζυμικό αντιοξειδωτικό και εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και σε αρκετά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια και τα υπεροξεισώματα, ενώ εντοπίζεται και ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα (Magnani & Mattevi, 2019).

1.2.6.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

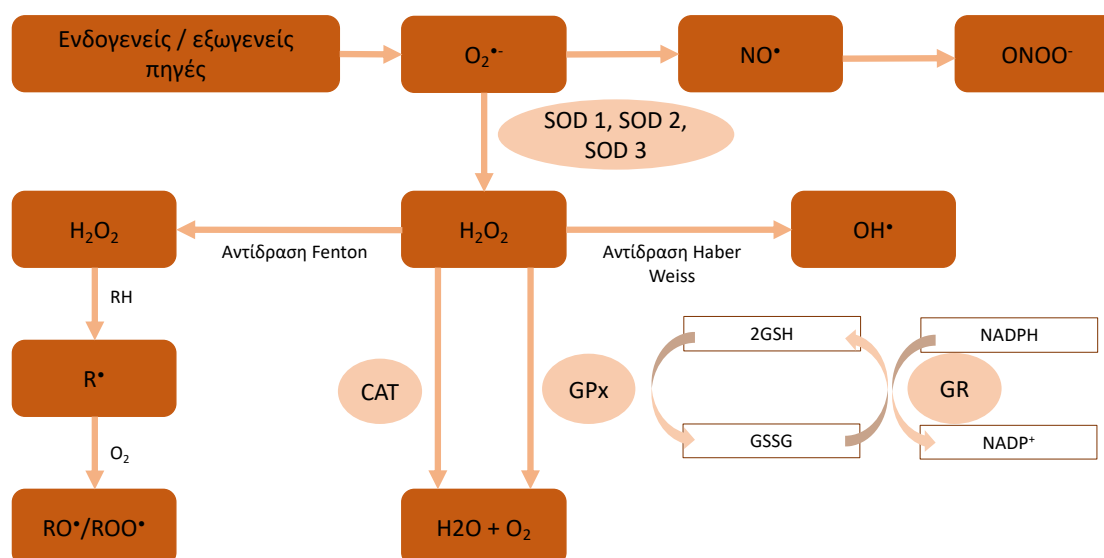
Η GPx είναι ένα ένζυμο το οποίο με υπόστρωμα τη γλουταθειόνη, την οποία οξειδώνει, μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό. Για να μπορέσει να δράσει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι απαραίτητο να υπάρχει ως συμπαραγοντας σελήνιο. Η αντίδραση που καταλύει παρουσιάζεται παρακάτω (Margis et al., 2008):



1.2.6.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης

Η GR είναι το ένζυμο που είναι επιφορτισμένο με τη μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH) η οποία μπορεί να οξειδωθεί ανάγοντας κάποια ελεύθερη ρίζα.

Το ένζυμο διαθέτει δύο ίδιες υπομονάδες, από τις οποίες κάθε μία διαθέτει στην ενεργή περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το FAD ανάγεται από το NADPH και στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με τη GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH (Couto et al., 2016).



Εικόνα 34: Σύνοψη δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων.

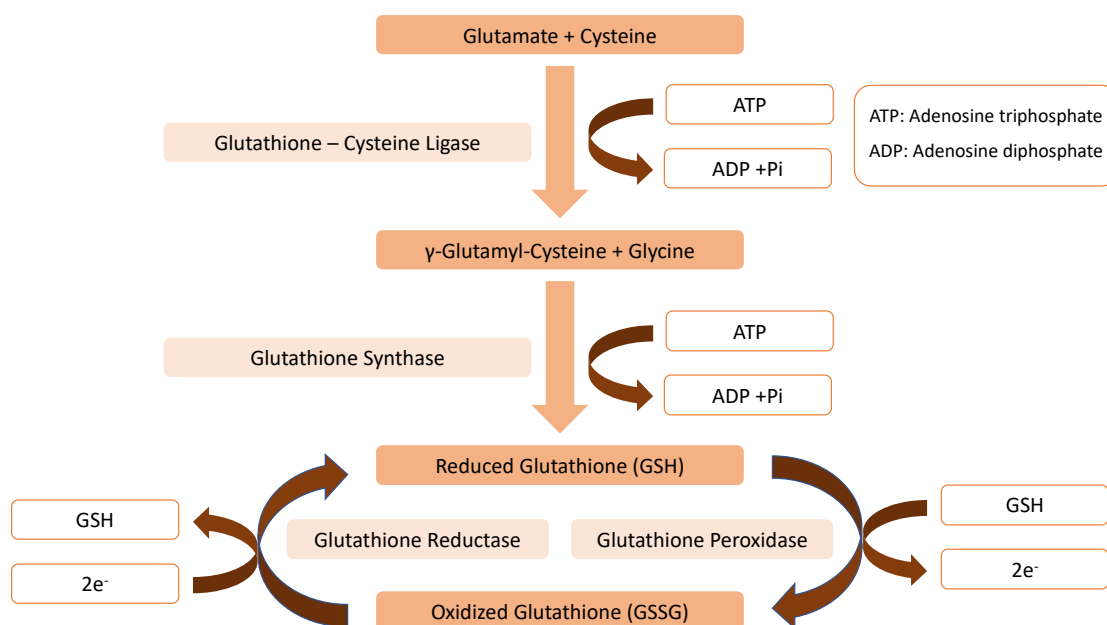
1.2.6.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.2.6.2.1 Γλουταθειόνη

Το κυριότερο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό μόριο που συναντάται στα κύτταρα είναι η γλουταθειόνη. Συναντάται στους οργανισμούς σε μεγάλες ποσότητες και έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων όσον αφορά την οξειδοαναγωγική τους ισορροπία. Η GSH είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από ένα L-γλουταμινικό οξύ, μία L-κυστεΐνη και μία γλυκίνη. Η σημαντική της δράση ως αντιοξειδωτικό οφείλεται στη σουλφυδρυλική ομάδα της κυστεΐνης όπου έχει την ικανότητα να ανάγει τις ελεύθερες ρίζες (Lobo et al., 2010).

Το 95% της γλουταθειόνης που βρίσκεται στα κύτταρα είναι υπό ανηγμένη μορφή (GSH), ενώ το υπόλοιπο 5% συναντάται στην οξειδωμένη μορφή GSSG(Lu, 2013; Ribas et al., 2014). Υπο φυσιολογικές συνθήκες η αναλογία μεταξύ των 2 μορφών είναι σταθερή. Όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός ελευθέρων ριζών και το κύτταρο χάνει την ομοιόστασή του, τότε η αναλογία είναι υπέρ της οξειδωμένης μορφής, καθώς η ίδια παράγεται με μεγάλους ρυθμούς, ενώ η ανηγμένη καταναλώνεται αντίστοιχα (Gaucher et al., 2018). Η ανισορροπία αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση γονιδίων και παραγωγή πρωτεϊνών με αντιοξειδωτική δράση, ενώ η δράση της GR επαναφέρει τα επίπεδα της GSH στα φυσιολογικά για το κύτταρο (Lu, 2013).

Τέλος, μία επιπλέον αντιοξειδωτική δράση αφορά την αλληλεπίδραση της γλουταθειόνης με άλλα αντιοξειδωτικά. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα κατά το οποίο η βιταμίνη E, η οποία μετατρέπεται ενζυμικά από την οξειδωμένη μορφή της στην ανηγμένη με υπόστρωμα την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (Forman et al., 2009).



Εικόνα 35: Αντιδράσεις κύκλου οξειδοαναγωγής γλουταθειόνης.

1.2.6.2.2 Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Ένα από τα σημαντικότερα εξωγενή, μη ενζυμικά, υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά είναι η βιταμίνη C. Οι φυσικοχημικές της ιδιότητες της επιτρέπουν να δρα τόσο μέσα στα κύτταρα όσο και εκτός αυτών. Η βιοδραστικότητά της βασίζεται στην ικανότητα της να προσφέρει ηλεκτρόνια σε ROS και RNS σχηματίζοντας λιγότερο δραστικά μόρια. Επιπλέον συνεισφέρει στη μετατροπή της οξειδωμένης βιταμίνης E στην ανηγμένη δραστική μορφή της (Pehlivan, 2017).

1.2.6.2.3 Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη E περιλαμβάνει μια σειρά από υδρόφοβα μόρια τοκοφερόλης, καθώς και τοκοτριενόλης, τα οποία παράγονται από φυτικούς οργανισμούς και βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε έλαια και σπόρους (Brigelius-Flohé & Davies, 2007). Τα τελευταία χρόνια γίνεται και τεχνητός εμπλουτισμός τροφίμων με βιταμίνη

E (Sundl et al., 2007). Η α-τοκοφερόλη έχει το μεγαλύτερο αντιοξειδωτικό ενδιαφέρον, καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των μεμβρανών από λιπιδική υπεροξείδωση (Kelley et al., 1995; Niki, 2007b; Traber & Atkinson, 2007; X. Wang & Quinn, 1999).

1.2.6.2.4 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες παράγονται φυσιολογικά στα φυτά ως αμυντικός μηχανισμός σε εξωτερικούς παράγοντες όπως το στρες, τα παθογόνα, η ξηρασία και άλλα. Καθώς παράγονται από τα φυτά μπορούν να βρεθούν σε μεγάλο αριθμό προϊόντων όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, τα δημητριακά, αλλά και σε πολλά ροφήματα με χαρακτηριστικά τον καφέ, το τσάι και τον οίνο (Costa et al., 2017; Karydas et al., 2020; Kouka, Tekos, et al., 2019; Kouka, Tsakiri, et al., 2019; Priftis et al., 2018, 2019; Tekos et al., 2021).

Λες οι πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτική δράση και εξουδετερώνουν της ελεύθερες ρίζες είτε προσφέροντας υδρογόνο είτε ηλεκτρόνιο. Τέλος έχουν την ικανότητα να χηλιώνουν μέταλλα μετάπτωσης όπως ο Fe^{2+} και με αυτό τον τρόπο να μειώνουν τη συχνότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης Fenton που έχει την δυνατότητα να σχηματίζει ιδιαίτερα δραστικά οξειδωτικά μόρια όπως ρίζες υπεροξυλίου και υδροξυλίου (Eran Nagar et al., 2023; H. Zhang & Tsao, 2016).

1.2.6.2.4.1 Πολυφαινόλες οίνου

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία μεγάλη κατηγορία ενώσεων με κύριο γνώρισμα μία βασική δομή 15 ατόμων άνθρακα που διαμορφώνονται σε δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μεταξύ τους με 3 άνθρακες. Συγκεκριμένα στον οίνο, οι ενώσεις αυτές έχουν μία υδροξυλομάδα στον πέμπτο και έβδομο άνθρακα του πρώτου δακτυλίου. Η δράση που έχουν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες είναι διττή, τόσο με την αναγωγή τους όσο και με τη μεταφορά σε αυτές μετάλλων τα οποία τις αδρανοποιούν (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Ανθοκυανίνες*

Οι ανθοκυανίνες είναι ενώσεις που βρίσκονται στον ερυθρό οίνο σε συγκεντρώσεις από 90 έως 400 mg/l ενώ σε καλά διατηρημένους οίνους μπορεί να φτάσουν ακόμα και τη συγκέντρωση των 700 mg/l. Οι 5 ανθοκυανίνες που υπάρχουν στον οίνο είναι:

1. Δελφινίνη,
2. Κυανιδίνη,
3. Πετουνιδίνη,
4. Πεονιδίνη,
5. Μαλβιδίνη (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Φλαβονόλες*

Στην κατηγορία αυτή υπάρχουν ενώσεις που βρίσκονται τόσο στο φλοιό αλλά και στον πυρήνα των ραγών με αποτέλεσμα να εντοπίζονται τόσο στο λευκό όσο και στον ερυθρό οίνο. Στους πρώτους η συγκέντρωση κυμαίνεται από 15 έως 25 mg/l, ενώ στους δεύτερους από 5 έως 120 mg/l. Οι φλαβονόλες που υπάρχουν στον οίνο χωρίζονται σε 2 κατηγορίες:

1. Μονομερή, όπως η κατεχίνη και η επικατεχίνη
2. Πολυμερή, όπως οι προανθοκυανιδίνες (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Φλαβονόλες*

Στην κατηγορία αυτή υπάρχουν ενώσεις που βρίσκονται μόνο στο φλοιό της ράγας και έχουν χαρακτηριστικές κίτρινες αποχρώσεις, ενώ συναντώνται μόνο στον ερυθρό οίνο σε συγκεντρώσεις περίπου στα 60 mg/l. Οι φλαβονόλες που υπάρχουν στον οίνο έχουν κίτρινες αποχρώσεις και είναι:

1. Μυρικήτινη,
2. Κουερσετίνη,
3. Λαρικήτινη,
4. Καμπερόλη,
5. Ισοχάμνετινη,
6. Συρινγκετίνη (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Ταννίνες*

Οι ταννίνες δημιουργούνται από την συνένωση των φλαβονολών και η συγκέντρωσή τους αυξάνεται με τη φυσική παλαίωση του οίνου, φτάνοντας σε μεγάλες συγκεντρώσεις από 1,1 έως 3,3 g/l.

Μια άλλη κατηγορία ταννινών είναι οι υδρολυόμενες οι οποίες έχουν μεγάλο μοριακό βάρος. Περιέχουν εστέρες του ελλαγικού και του γαλλικού οξέος που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκόζη ή και άλλα σάκχαρα. Στον οίνο συναντώνται μόνο σε παλαιωμένα βαρέλια σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,3 έως 50 mg/l (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Φλαβανόνες*

Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής περιέχονται τόσο σε λευκούς όσο και σε ερυθρούς οίνους με συγκέντρωση περίπου 7,5 mg/l στους πρώτους και 25 mg/l στους δεύτερους. Η κύρια ένωση της ομάδας αυτής στον οίνο είναι η ναρινγενίνη (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Φλαβόνες*

Οι φλαβόνες είναι η μόνη ομάδα στην οποία δεν υπάρχει η υδροξυλομάδα, ανιχνεύονται τόσο στον ερυθρό αλλά και στο λευκό οίνο σε συγκεντρώσεις από 0,1 έως 1 mg/l (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

Μη φλαβονοειδή

- *Υδροξυβενζοϊκά οξέα*

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι ενώσεις που βασίζονται στο βενζοϊκό οξύ. Στους οινούς μπορεί να μην υπάρχει καθόλου αλλά να φτάσει μέχρι και τα 220 mg/l. τα κυριότερα μόρια που ανιχνεύονται είναι:

1. π-υδροξυβενζοϊκό,
2. γαλλικό, το οποίο ανιχνεύεται έως και σε 10 mg/l στους λευκούς και έως 70 mg/l στους ερυθρούς.
3. βανιλλικό,
4. γεντισικό,
5. συρινγικό,

6. σαλικυλικό,
7. πρωτοκατεχικό (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Υδροξυκινναμικά οξέα*

Τα μόρια της ομάδας αυτής έχουν σαν βάση το κινναμικό οξύ, ενώ ανιχνεύονται στους λευκούς οίνους σε συγκέντρωση έως 30 mg/l και στους ερυθρούς έως 100 mg/l. Οι κυριότερες ουσίες της κατηγορίας αυτής είναι:

1. Καφεϊκό οξύ,
2. Κουμαρικό οξύ,
3. Σιναπικό οξύ,
4. Φερουλικό οξύ (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Στιλβένια*

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πολλές ενώσεις με κυριότερη την ρεσβερατρόλη. Άλλες οι ενώσεις της ομάδας αυτής εντοπίζονται κατεξοχήν στις ράγες και επομένως στον παραγόμενο οίνο και αποτελούν την κύρια πηγή για τον ανθρώπινο οργανισμό. Χαρακτηριστικό είναι ότι το αμπέλι για να δημιουργήσει στιλβένια πρέπει να υποστεί κάποια διαδικασία στρες είτε από κάποιο παθογόνο ή από κλιματολογικά φαινόμενα. Δέντρα που έχουν υποστεί κάποιου είδους καταπόνηση παράγουν στιλβένια σε συγκεντρώσεις έως και 100 mg/l, ενώ σε ιδανικές συνθήκες για το φυτό όπου δεν υπάρχει κάποιος στρεσογόνος παράγοντας οι αντίστοιχες τιμές μπορεί να είναι από μη ανιχνεύσιμες έως 5 mg/l. Όσον αφορά τη ρεσβερατρόλη, την κύρια ένωση που έχει δώσει στους γαλλικούς οίνους τη διεθνή τους φήμη με την συνεισφορά τους στο Γαλλικό παράδοξο, αυτή ανιχνεύεται έως και σε 155 µg/l στον λευκό και σε 1,55 mg/l στον ερυθρό οίνο (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- *Τυροσόλη*

Η συγκεκριμένη ένωση εμφανίζει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση και κύρια πηγή για τον ανθρώπινο οργανισμό είναι το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Στους οίνους υπάρχει σε συγκεντρώσεις έως 45 mg/l για τους λευκούς και από 20 έως 40 mg/l για τους ερυθρούς (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

- Υδροξυτυροσώλη

Η συγκεκριμένη ένωση είναι μία φαινυλαιθυλική αλκόολη η οποία μαζί με την τυροσώλη ευθύνεται για το μοναδικό ισχυρισμό υγείας που έχει δώσει η Ευρωπαϊκή Ένωση σε πολυφαινόλες για αντιοξειδωτική δράση και συγκεκριμένα μόνο για τις πολυφαινόλες του ελαιολάδου. Ωστόσο, η ένωση αυτή ανιχνεύεται και στον ερυθρό κυρίως οίνο σε συγκέντρωση από 2 έως περίπου 4 mg/l (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

1.2.6.2.5 Ουβικινόνη ή συνένζυμο Q

Το συνένζυμο Q (CoQ, ουβικινόνη) είναι ένα μικρό, λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό που παράγεται *de novo* στους αερόβιους οργανισμούς και δρα ως συμπαραάγοντας στην αναπνευστική αλυσίδα, στη σειρά αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που εμπλέκονται στη σύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Hernández-Camacho et al., 2018). Η αντιοξειδωτική δράση που ασκεί είναι είτε άμεση εξουδετερώνοντας ρίζες υπεροξειδίου ή έμμεση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Littarru & Tiano, 2007).

1.2.6.2.6 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το σημαντικότερο αντιοξειδωτικό του πλάσματος και δρα ενάντια σε πληθώρα ιδιαίτερα δραστικών ελευθέρων ριζών ROS, RNS, RCS. Το αντιοξειδωτικό αυτό προέρχεται από την αποικοδόμηση των πουρινών (Boban & Modun, 2010; GK et al., 2005; Sautin & Johnson, 2008; Vukovic et al., 2009).

1.2.7 Οξειδωτικό στρες

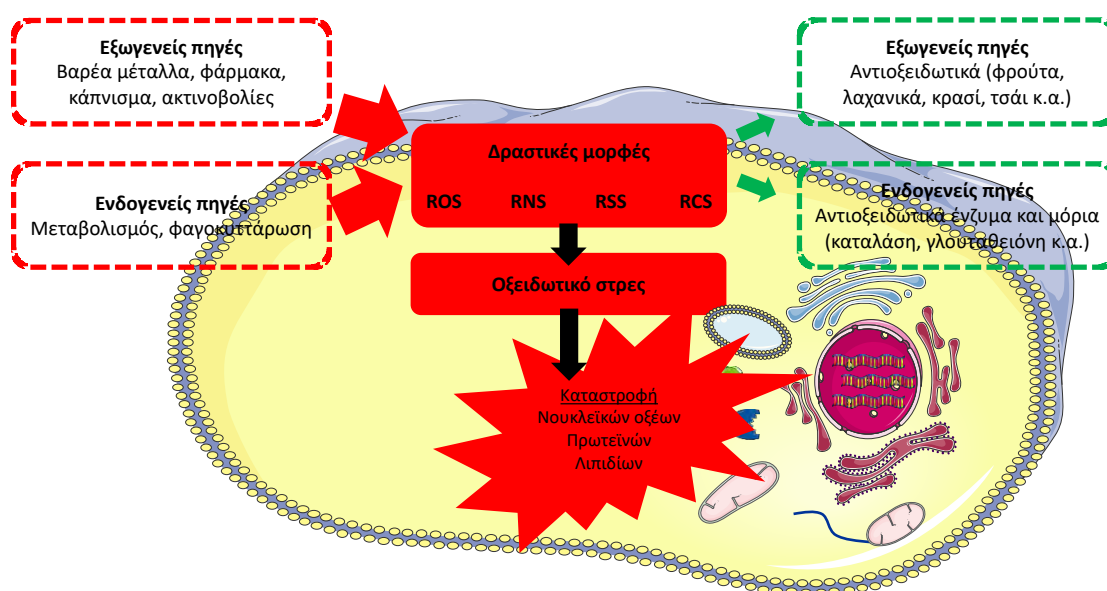
Το οξειδωτικό στρες περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τον καθηγητή φυσικής και βιοχημείας Helmut Sies το 1985, ενώ λίγα χρόνια αργότερα το 1991 ο ίδιος το όρισε ως «η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων». Η διαταραχή που περιγράφει ο Καθηγητής οφείλεται στο σχηματισμό ROS και RNS που προκύπτει είτε ενδογενώς (π.χ. από διαδικασίες του μεταβολισμού) είτε εξωγενώς (π.χ. ακτινοβολίες) και την ικανότητα που έχει το κύτταρο και κατ' επέκταση ο οργανισμός να τα αδρανοποιεί και οφείλεται:

1. Σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών
2. Σε μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα
3. Σε συνδυασμό των παραπάνω (Sies, 1991)

Μία δεκαετία μετά και συγκεκριμένα το 2006 ο καθηγητής Βιοχημείας Dean Jones του Πανεπιστημίου Emory της Ατλάντας, προχώρησε ένα βήμα παρακάτω τον ορισμό του οξειδωτικού στρες ως «η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης» (Jones, 2006).

Ο ορισμός που περιγράφει καλύτερα το οξειδωτικό στρες διατυπώθηκε σχεδόν δέκα χρόνια αργότερα, πάλι από τον Helmut Sies ως «η διαταραχή προ-οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ή/και σε μοριακή βλάβη» (Sies, 2015).

Το αποτέλεσμα του παραπάνω ορισμού οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το οξειδωτικό στρες σχετίζεται τόσο με την εσφαλμένη ενδοκυτταρική και διακυτταρική σηματοδότηση, τη διατάραξη της ομοιόστασης και τέλος της συσσώρευση βλαβών σε διάφορα μακρομόρια (Chrysoula et al., 2011; Margaritelis et al., 2015; Skaperda, Tekos, Vardakas, et al., 2021; A. S. Veskoukis, Tsatsakis, et al., 2020).



Εικόνα 36: Οξειδωτικό στρες υφίσταται σε κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών.

Το φαινόμενο αυτό θεωρήθηκε από την πρώτη στιγμή που περιγράφηκε ως μια παθολογική κατάσταση του οργανισμού που μπορεί να είναι η ίδια η εμφάνιση του οξειδωτικού στρες η αιτία της παθογένειας ή η εμφάνιση του να είναι το αποτέλεσμα άλλων υποβόσκουσων νόσων. Από το 1991 και μετά πολλοί ερευνητές έχουν συσχετίσει το οξειδωτικό στρες με ασθένειες όπως νευροεκφυλιστικές, φλεγμονές, καρδιαγγειακά, διαβήτη, καρκίνο κ.α. (Bhatia & Sharma, 2021; Boutten et al., 2011; Bubb et al., 2020; Cabello-Verrugio et al., 2017; Cederbaum, 2009; Z. Chen & Zhong, 2014; Forman & Zhang, 2021; García et al., 2017; Hybertson et al., 2011; Jomova & Valko, 2011; Kamat et al., 2016; Kontoghiorghes & Kontoghiorghes, 2019; Packer, 2002; Sies, 2015; Ursini et al., 2016; Valko et al., 2005, 2006, 2016; Wadley et al., 2013; Wronka et al., 2022; Zhu et al., 2008).

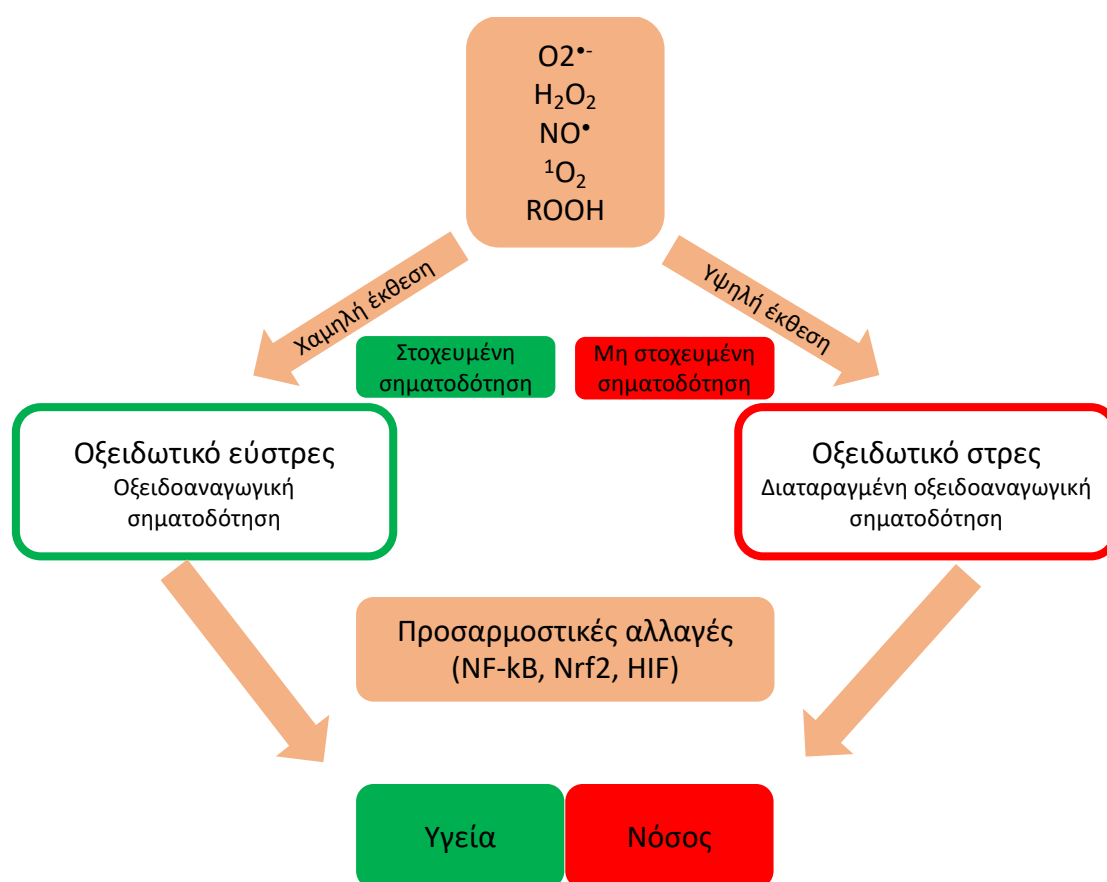


Εικόνα 37: Οξειδωτικό στρες και επαγόμενες αρνητικές επιπτώσεις σε όργανα και ασθένειες.

Από την άλλη πλευρά την τελευταία δεκαετία υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι οι δραστικές μορφές παρουσιάζουν και θετικές δράσεις κυρίως όταν βρίσκονται μέχρι ένα συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης στα κύτταρα. Σε αυτές τις συνθήκες παίρνουν μέρος σε βασικές διεργασίες των κυττάρων όπως η σηματοδότηση, ο μεταβολισμός και ο κυτταρικός κύκλος με τον πολλαπλασιασμό και τον

προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Οι παραπάνω διεργασίες οφείλονται στο φαινόμενο της όρμησης, κατά το οποίο δυνητικά επικίνδυνα μόρια οδηγούν στην προσαρμογή του κυττάρου, επάγοντας τους αμυντικούς του μηχανισμούς και τη μεταγραφή γονιδίων για παραγωγή προστατευτικών πρωτεϊνών και ενζύμων (E. J. Calabrese et al., 1999; E. J. Calabrese & Baldwin, 1998a, 1998b, 2001a, 2001b, 2002, 2003; E. J. Calabrese & Blain, 2005, 2011; Mattson, 2008; Radak, Chung, & Goto, 2008; Radak, Chung, Koltai, et al., 2008; Radak et al., 2005).

Τα χαμηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών, παρότι δεν είναι γνωστό ποια είναι ακριβώς τα κρίσιμα επίπεδα, οδηγούν στην παραγωγή αντιοξειδωτικών, καθώς και επιδιορθωτικών πρωτεϊνών που έχουν ως στόχο τη μεταβολική υγεία και ευεξία του κυττάρου και επομένως του οργανισμού. Με βάση τα νέα αυτά ευρήματα δημιουργείται ένας νέος όρος αυτός του οξειδωτικού εύστρες (Bai et al., 2022; Bienertova-Vasku et al., 2020; Milsum, 1985; Niki, 2007a, 2016; Sies, 2017, 2021; Sies et al., 2017; Sies & Jones, 2020).

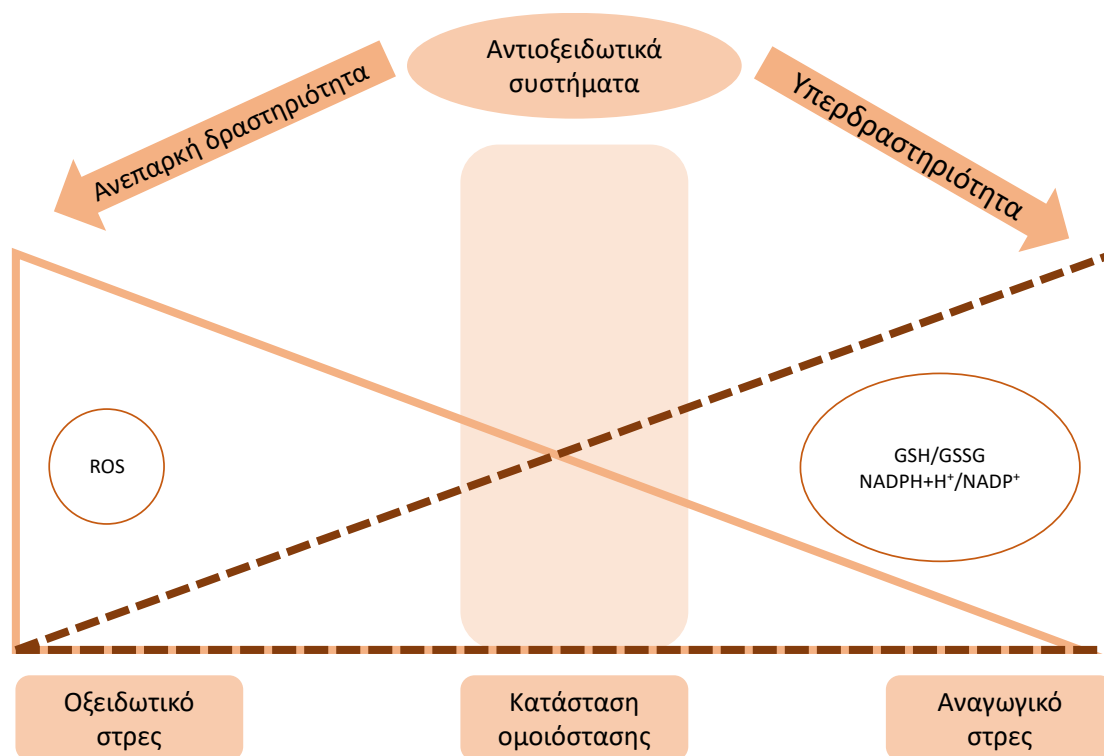


Εικόνα 38: Οξειδωτικό στρες και οξειδοαναγωγική σηματοδότηση.

Τέλος, αξίζει να γίνει ξεχωριστή αναφορά στο αναγωγικό στρες. Αν και το ερευνητικό ενδιαφέρον για το οξειδωτικό στρες είναι ιδιαίτερα υψηλό από την ανακάλυψή του, το αναγωγικό στρες παρότι αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Albert Wendel το 1987, δεν έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας.

Το αναγωγικό στρες λαμβάνοντας υπόψιν τον ορισμό του οξειδωτικού στρες μπορεί να οριστεί ως μία συνθήκη των κυττάρων ή/και των οργανιδίων τα οποία βρίσκονται σε μία, όπως θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε, υψηλότερου επιπέδου αναγωγική κατάσταση με γνώμονα τα φυσιολογικά επίπεδα. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν καταβάλει έντονες προσπάθειες για την προσέγγιση του αναγωγικού στρες, μιας κατάστασης κατά την οποία τα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη αντιοξειδωτική άμυνα και μειωμένη παραγωγή ελεύθερων ριζών έπειτα από ένα ερέθισμα που αλλάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση (Spanidis et al., 2018). Κατά το αναγωγικό στρες οι δέκτες ηλεκτρονίων βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Είναι δυνατόν να προκληθεί από υψηλές ποσότητες γλουταθειόνης και μπορεί να συμβάλει στην κυτταροτοξικότητα. Αν και τα διαφορετικά οργανίδια του κυττάρου, βρίσκονται σε διαφορετικά επίπεδα οξειδωτικού/αναγωγικού στρες, μέσω της ανίχνευσης για παράγοντες όπως η γλουταθειόνη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), προσδιορίστηκε ότι το αναγωγικό στρες υπάρχει στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) των γηρασμένων κυττάρων. Από τη μία πλευρά, η διεθνής βιβλιογραφία συμφωνεί με το γεγονός ότι το αναγωγικό στρες μπορεί να είναι επιβλαβές για τα ευκαρυωτικά κύτταρα με ειδική αναφορά στην GSH και στην αναλογία οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης (GSH/GSSG). Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια του αναγωγικού στρες και παρόμοια με το οξειδωτικό στρες, η παραγωγή ROS κατακλύζει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να τις εξουδετερώνουν. Ως εκ τούτου, τα υψηλά επίπεδα GSH φαίνεται να είναι επιβλαβή προκαλώντας μιτοχονδριακή οξείδωση και κυτταροτοξικότητα. Από την άλλη πλευρά, έχει αποδειχθεί ότι το αναγωγικό στρες μπορεί να προκαλεί και ευεργετικά αποτελέσματα, ιδίως μετά την άσκηση (Spanidis et al., 2018). Ως πιθανοί λόγοι μπορούν να χαρακτηριστούν η υποξία όπως και η αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας. Οι παραπάνω λόγοι μπορούν να οδηγήσουν σε χαμηλότερα επίπεδα δραστικών μορφών αναφορικά με την αντιοξειδωτική άμυνα (Aon et al., 2010; Bauersachs & Widder, 2010; Korge et al., 2015; Margaritelis et al., 2014,

2018; Pérez-Torres et al., 2017; Ralser & Benjamin, 2008; A. S. Veskoukis et al., 2012, 2021; A. S. Veskoukis, Tsatsakis, et al., 2020).

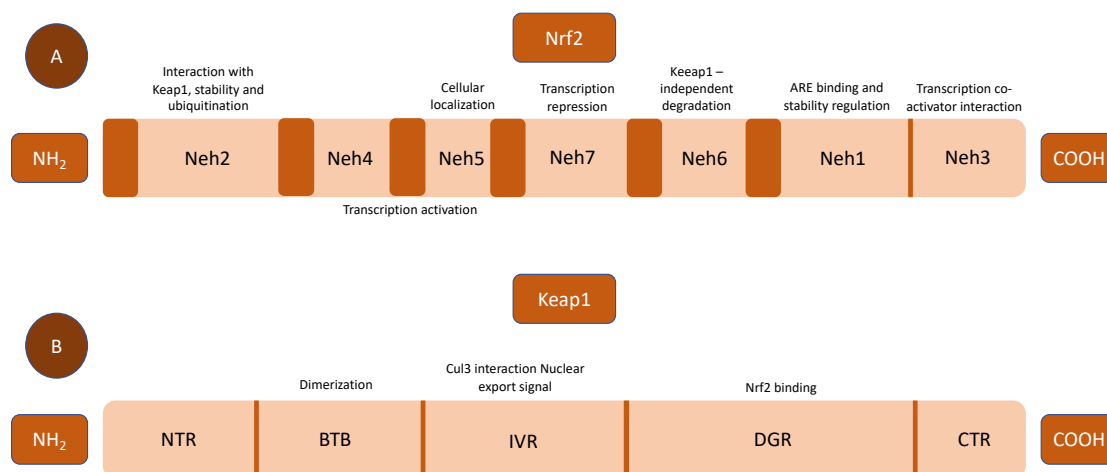


Εικόνα 39: Οξειδωτικό και αναγωγικό στρες.

1.2.8 Το αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2-KEAP1

Το οξειδωτικό στρες ελέγχεται από τα κύτταρα με καλά διατηρημένους μηχανισμούς που αποσκοπούν στη διατήρηση της ομοιόστασής τους. Έτσι, τα κύτταρα διαθέτουν μια ομάδα γονιδίων που ενεργοποιούνται ως απάντηση στρεσογόνων παραγόντων. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το βασικότερο σύστημα είναι αυτό του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 με την πρωτεΐνη αναστολέα Keap1 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Kelch-like ECH-associated protein 1) (Kaspar et al., 2009; Niture et al., 2010, 2014). Στο σύστημα αυτό, ο Nrf2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που έχει ως στόχο την ενεργοποίηση γονιδίων με σκοπό την αύξηση των αντιοξειδωτικών και την επαναφορά της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Ο Nrf2 μέχρι να ενεργοποιηθεί παραμένει προσδεδεμένος με τον καταστολέα του Keap1. Η σίγαση του Nrf2 σε ποντίκια οδηγεί σε ταχεία εξέλιξη διάφορων ασθενειών, όπως η

νευροπάθεια λόγω διαβήτη, το μεταβολικό σύνδρομο, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, καθώς και νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το Αλτσχάιμερ (Baird & Yamamoto, 2020; Uruno et al., 2015).



Εικόνα 40: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και της πρωτεΐνης καταστολέας του Keap1.

Ο Nrf2 είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στις Cap-n-Collar πρωτεΐνες με χαρακτηριστικό γνώρισμα το «φερμουάρ λευκίνης» που διαθέτουν. Το χαρακτηριστικό αυτό βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και είναι επιφορτισμένο με τη σύνδεση του ενεργοποιητή για τη μεταγραφή των υποκινητών των διάφορων γονιδίων-στόχων. Η οικογένεια των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για διάφορες διεργασίες που σχετίζονται τόσο με την ανάπτυξη ενός οργανισμού όσο και με την απάντηση στο οξειδωτικό στρες (Blackwell et al., 2015; Pitoniak & Bohmann, 2015; Sykietis & Bohmann, 2010).

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μια σειρά από άρθρα που αναφέρεται στη χρήση του NMR και της κρυσταλλογραφίας X-Ray για τη διαλεύκανση των λειτουργικών περιοχών του Nrf2, οι οποίες απεικονίζονται στην παραπάνω εικόνα (Bellezza et al., 2018; B. Chen et al., 2015; Stępkowski & Kruszewski, 2011). Συγκεκριμένα οι 7 περιοχές του Nrf2 επιτελούν τις παρακάτω δράσεις (Bellezza et al., 2018; Canning et al., 2015; F. He et al., 2020; Xu et al., 2000; J. Zhang et al., 2007):

Neh2: Υπεύθυνη περιοχή για την σύνδεση με τον Keap1 καθώς και την αποικοδόμηση του Nrf2 μέσω ουβικιτινίωσης.

Neh4: Συν ενεργοποιητής του Nrf2 (π.χ. σύνδεση με το cAMP)

Neh5: Εξασφαλίζει την είσοδο του Nrf2 στον πυρήνα του κυττάρου.

Neh7: Παρουσιάζει κατασταλτική δράση για τον Nrf2 (π.χ. σύνδεση με υποδοχέα RXRα).

Neh6: Υπεύθυνη περιοχή για την αποικοδόμηση του Nrf2 μέσα στον πυρήνα από το πρωτεάσωμα.

Neh1: Διαθέτει τη χαρακτηριστική δομή του φερμουάρ της λευκίνης και είναι η υπεύθυνη περιοχή για τον εντοπισμό των περιοχών ARE (Antioxidant Response Elements) στον υποκινητή των γονιδίων στόχων του Nrf2. Επίσης είναι η περιοχή της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις bZIP και MAF πρωτεΐνες που βοηθούν στη διαδικασία της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων. Τέλος μπορεί να συνδεθεί με το ένζυμο UbcM2, το οποίο είναι βασικό υπόστρωμα της λιγάσης E2, με αποτέλεσμα να καθορίζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης.

Neh3: Η περιοχή αυτή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του Nrf2 και παίζει βοηθητικό ρόλο στη διαδικασία της μεταγραφής.

σον αφορά την Keap1, είναι η πρωτεΐνη που παίζει το ρόλο του αρνητικού ρυθμιστή του Nrf2 και ανήκει στην οικογένεια των BTB-Kelch πρωτεϊνών. Όταν υπάρχει οξειδοαναγωγική ισορροπία στο κύτταρο ο Keap1 συγκρατεί τον Nrf2 στο κυτταρόπλασμα, ενώ παράλληλα τον οδηγεί και σε πρωτεασωματική αποικοδόμηση.

Η η οικογένεια των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για διάφορες διεργασίες που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό, την ουβικιτινίωση, και την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας με την συγκράτηση του μεταγραφικού παράγοντα εκτός πυρήνα (Dhanoo et al., 2013). Συγκεκριμένα οι 5 περιοχές του Keap1 έχουν τις παρακάτω δράσεις:

BTB: Σύνδεση με την πρωτεϊνική λιγάση Cullin 3

IVR: Σύνδεση με την πρωτεϊνική λιγάση Cullin 3

DGR: Περιοχή όπου περιέχει Kelch μοτίβα και συνδέεται με την Neh2 επικράτεια του Nrf2 όταν υπάρχει οξειδοαναγωγική ισορροπία. Όταν παρουσιαστεί ανισορροπία και οξειδωτικό στρες, η συγκεκριμένη περιοχή αποδεσμεύεται και ο Nrf2 κατευθύνεται στον πυρήνα (Bellezza et al., 2018; Canning et al., 2015; Gugliandolo et al., 2020; Lo et al., 2006; Silvestro & Mazzon, 2022; R. Zhang et al., 2017).

1.2.9 Η μεσολάβηση της οδού NRF2-KEAP1 στο οξειδωτικό στρες και στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών

Μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η έλλειψη του Nrf2 οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα ενζύμων του μεταβολισμού της φάσης II (Bellezza et al., 2018). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο μοριακός διακόπτης Nrf2-Keap1 ρυθμίζει την έκφραση μιας ομάδας από ένζυμα που σχετίζονται και με τις τρεις φάσεις του μεταβολισμού ξενοβιοτικών οι οποίες είναι (Bellezza et al., 2018; F. He et al., 2020; Uruno et al., 2015):

1^η φάση: Αντιδράσεις που περιλαμβάνουν οξειδώσεις, υδρολύσεις και αναγωγές (από ένζυμα όπως η οξειδοαναγωγάσες του P450, η αλδεϋδοαφυδρογονάση 1 και οι καρβονυλοαναγωγάσες).

2^η φάση: Περιλαμβάνει τη σύνδεση των τοξικών παραγώγων της 1^{ης} φάσης με μόρια όπως η γλουταθειόνη, η γλυκίνη, η κυστεΐνη κ.α. ώστε να μετατραπούν σε αδρανή μόρια (πραγματοποιείται από ένζυμα όπως η GST, η UGR, η NG01 κ.α.).

3^η φάση: Περιλαμβάνει τα ένζυμα που σχετίζονται με την έξοδο των ξενοβιοτικών από τον οργανισμό (πχ MDRs, BCRP κ.α.)

Η μεταφορά του Nrf2 στον πυρήνα σχετίζεται με την έκφραση ορισμένων από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια όπως της γλουταθειόνης, με την έκφραση των GCLC, GCLM και GSS αλλά και άλλων ενζύμων όπως η SOD1, η CAT, η GR, η GPx κ.α (Bajpai et al., 2017; Gallorini et al., 2015; Giudice et al., 2010; F. He et al., 2020; Qaisiya et al., 2014; Tonelli et al., 2018). Καθώς ο Nrf2 σχετίζεται με την προστασία του κυττάρου από το οξειδωτικό στρες, θα μπορούσε να παίξει σημαντικό ρόλο ως στόχος φαρμάκων για μια σειρά από ασθένειες που έχουν συσχετισθεί με το φαινόμενο αυτό όπως ο καρκίνος, καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης, καθώς και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Φυσικά χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς στην περίπτωση του καρκίνου για παράδειγμα, η προστασία που προσφέρει ο Nrf2 από το οξειδωτικό στρες, τη χρόνια φλεγμονή μπορεί να προστατεύσει ένα φυσιολογικό κύτταρο από το να μετατραπεί σε καρκινικό, αλλά και ένα προ-καρκινικό κύτταρο να οδηγηθεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Deshmukh et al., 2017a; Leinonen et al., 2014; Panieri, Telkoparan-Akillilar, et al., 2020; Song et al., 2021; Stefanson & Bakovic, 2014; Tu et al., 2019; S. Wu et al., 2019).

1.2.10 Η οδός NRF2-KEAP1 και ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός του κυττάρου

Με την ενεργοποίηση του Nrf2 εκφράζονται μεταξύ άλλων και τα γονίδια που σχετίζονται με τη γλυκόλυση με την ενίσχυση του μεταφορέα γλυκόζης 1 στο εσωτερικό των κυττάρων αλλά και στην έκφραση κινασών όπως οι Hexokinase 1 & 2 αλλά και η PFK2, το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων με τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό φωσφολιπιδίων και τριγλυκεριδίων, την οξείδωση β λιπαρών οξέων. Αντίθετα με όλες τις παραπάνω ενεργοποιήσεις, ο Nrf2 έχει ανασταλτική δράση στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης (F. He et al., 2020).

Επιπλέον, ο Nrf2 παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη σύνθεση όσο και την αποικοδόμηση της αίμης, μόριο με κομβικό ρόλο σε πολλές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής των κυττάρων (F. He et al., 2020).

1.2.11 Ο ρόλος του NRF2 στο μεταβολισμό των λιπιδίων

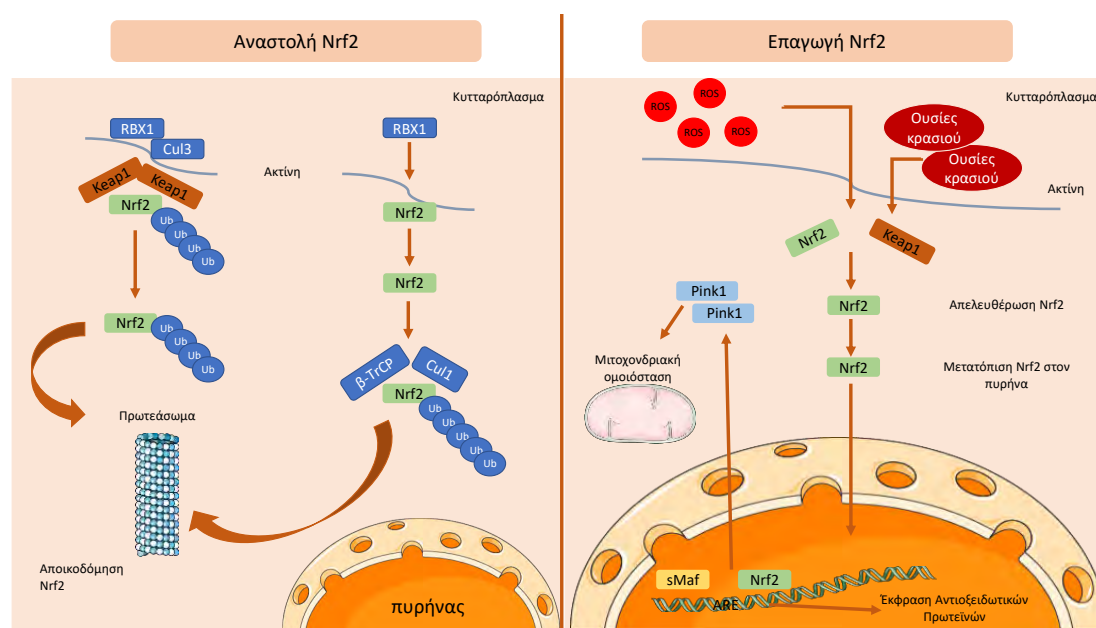
Επιπλέον ο Nrf2 βρέθηκε ότι ασκεί μια αρνητική επίδραση στη βιοσύνθεση των λιπιδίων. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν τη μειωμένη έκφραση των ACLY, FAT και SCD-1. Πιο συγκεκριμένα, η ACLY συμμετέχει ενεργά στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης. Ταν στο κύτταρο υπάρχει περίσσεια υδατανθράκων, η ACLY χρησιμοποιεί το κιτρικό που παράγεται από τον κύκλο του Krebs και το μετατρέπει σε ακέτυλο-CoA. Στη συνέχεια, αυτό μετατρέπεται σε μηλονυλο-CoA και 7 μόρια μηλονυλο-CoA και ένα ακέτυλο-CoA οδηγούν στη σύνθεση του παλμιτικού οξέος από τη συνθάση των λιπαρών οξέων (Batchuluun et al., 2022). Αν και οι λόγοι για την αρνητική δράση του Nrf2 στη σύνθεση των λιπαρών οξέων δεν είναι ακόμα γενικώς αποδεκτοί από την επιστημονική κοινότητα, μια πιθανή εξήγηση αφορά την οικονομία του NADPH, με σκοπό να αξιοποιηθεί στους μηχανισμούς άμυνας και τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (Deshmukh et al., 2017b; Heiss et al., 2013; C. Li et al., 2022; Ludtmann et al., 2014; Panieri, Buha, et al., 2020; K. C. Wu et al., 2012).

1.2.12 Συστατικά του οίνου ως ρυθμιστές του συστήματος NRF2-KEAP1

Αν και δεν είναι γνωστός ακριβώς ο μοριακός μηχανισμός δράσης των φυσικών συστατικών στο σύστημα Nrf2 - Keap1, οι περισσότερες μελέτες καταλήγουν στην

τροποποίηση της στερεοδιαμόρφωσης της Keap1 και επομένως την απελευθέρωση του Nrf2 (Keum & Choi, 2014; Qader et al., 2020; Taguchi et al., 2011).

Ο οίνος περιέχει μόρια όπως η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη, η προκυανιδίνη B2, η σιλιβινίνη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη κ.α. που ασκούν τη δράση τους μέσω της ενεργοποίησης του Nrf2 (Keum & Choi, 2014; Martínez-Huélamo et al., 2017; Qader et al., 2020; Taguchi et al., 2011). Σχηματική αναπαράσταση της αναστολής και της επαγωγής του Nrf2 παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 41: Αναστολή και επαγωγή του Nrf2.

2 Σκοπός

Οι ευεργετικές ιδιότητες του οίνου είναι γνωστές σχεδόν από την ανακάλυψή του, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται εμπειρικά αλλά και με την μορφή «συνταγής» από τον Ιπποκράτη και τους σύγχρονούς του. Στη σύγχρονη εποχή υπάρχουν πολλές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που αναζητούν, αναδεικνύουν και ελέγχουν λευκούς και ερυθρούς οίνους από όλο τον κόσμο σε μία προσπάθεια να ανιχνεύσουν βιοδραστικές ουσίες ή / και τους θεραπευτικούς τους στόχους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ρεσβερατρόλη, ένα στυλβένιο με αντιφλεγμονώδεις, αντιγηραντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι εργασίες που δημοσιεύθηκαν για τους γαλλικούς οίνους και την περιεκτικότητά τους σε ρεσβερατρόλη και άλλες βιοενεργές ενώσεις, σε συνδυασμό με τα χρήματα που επενδύθηκαν για τη διάχυση των αποτελεσμάτων αυτών σε όλο τον κόσμο από διεθνή μέσα μαζικής ενημέρωσης και από διακεκριμένους επιστήμονες δημιούργησαν ένα πολύ μεγάλο brand γύρω από τους γαλλικούς οίνους.

λα ξεκίνησαν το 1991 όταν ο Γάλλος ερευνητής Serge Renaud έδωσε μία συνέντευξη σε διεθνή ΜΜΕ με τίτλο «το γαλλικό παράδοξο». Συνοπτικά, ανέφερε ότι παρά το γεγονός ότι οι Γάλλοι πολίτες ακολουθούν μία πολύ κακή διατροφή και ζωή με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, καθώς καταναλώνουν πολλά λιπαρά, καπνίζουν και δεν αθλούνται, εμφανίζουν καρδιαγγειακές παθήσεις σε ποσοστό που ισούται με το μισό σε σύγκριση με τους πολίτες των ΗΠΑ. Ο ερευνητής απέδωσε το φαινόμενο αυτό στην κατανάλωση οίνου και συγκεκριμένα στα 60 λίτρα ετησίως ανά άτομο που καταναλώνουν οι Γάλλοι σε σχέση με τα 7 λίτρα των πολιτών στις ΗΠΑ. Αυτό ήταν η αρχή μιας σειράς δημοσιεύσεων και αναφορών που δημιούργησε μία αγορά για εξαγωγές γαλλικών κρασιών που την τελευταία πενταετία είναι σχεδόν 10 δισεκατομμυρίων ευρώ ανά έτος.

Στην Ελλάδα οι εξαγωγές κατά τα τελευταία 5 χρόνια ανέρχονται στα 80 εκατομμύρια ευρώ το έτος.

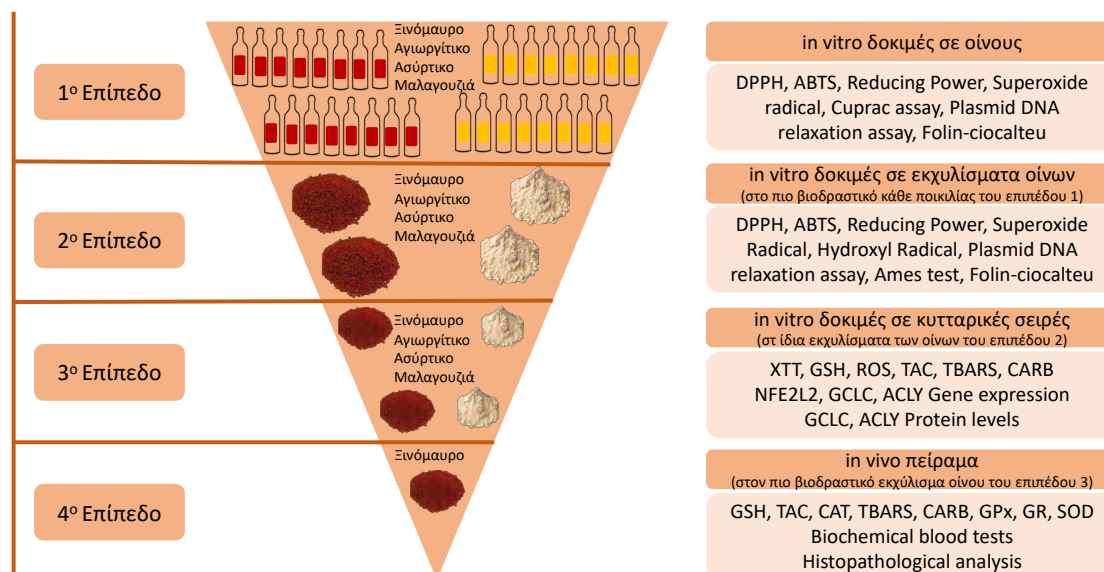
Η Ελλάδα είναι μία χώρα με περισσότερες από 60 οινοπαραγωγικές ποικιλίες αμπέλου. Τα αμπέλια συναντώνται σε όλα τα εδάφη της χώρας, από τα βόρεια και τα ορεινά μέχρι τα πεδινά αλλά και τα νησιά του Αιγαίου και Ιονίου πελάγους. Μεγαλώνουν κάτω από αντίξοες συνθήκες και παράγουν τα σταφύλια σε ακραία υψηλές θερμοκρασίες το καλοκαίρι ή και πολύ χαμηλές στη Βόρεια Ελλάδα το

χειμώνα, ενώ αντιμετωπίζουν και μεγάλες περιόδους ανυδρίας με ταυτόχρονα ιδιαίτερα υψηλούς σε μποφόρ ανέμους του Αιγαίου. Λες οι παραπάνω συνθήκες είναι αυτές που η βιβλιογραφία αναφέρει ότι παράγουν τους καλύτερους σε ποιότητα οίνους στον κόσμο από πλευράς βιοδραστικότητας, αλλά και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Δυστυχώς τα περασμένα χρόνια δεν είχε γίνει συστηματική έρευνα στους ελληνικούς οίνους, με τις μεγαλύτερες ποσότητες να διακινούνται «χύμα» ή ως χαμηλής αξίας προϊόντα. Τα τελευταία χρόνια με δράσεις όπως «οι δρόμοι των αμπελώνων», καθώς και πρωτοβουλιών καθηγητών και εργαστηρίων της χώρας σε συνεργασία με οινοποιεία γίνεται μία προσπάθεια αρχικά για την εύρεση των ιδιοτήτων και των ευεργετικών για την υγεία του ανθρώπου βιοενεργών ενώσεων που περιέχονται στους ελληνικούς οίνους και τελικά την ανάδειξη αυτών με ταυτόχρονη αύξηση της προστιθέμενης αξίας των προϊόντων.

Αυτός είναι και ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η μελέτη και ανάδειξη των ιδιοτήτων των ελληνικών ερυθρών και λευκών οίνων με σκοπό δυνητικά να αποκτήσουν αναγνώριση βάσει της πραγματικής τους αξίας και να αποτελέσουν έναν πραγματικό πυλώνα για την οικονομία και τις εξαγωγές της χώρας.

Για να επιτευχθεί ο παραπάνω σκοπός δημιουργήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός της διατριβής ο οποίος βασίζεται σε μία σειρά προηγούμενων μελετών, από άλλα Ελληνικά προϊόντα, του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών και Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Γκουτζουρέλας, 2016; Κερασιώτη, 2014; Κούκα, 2020; Πρίφτης, 2019; Σκαπέρδα, 2022) και έχει περιγραφεί και από τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Αριστείδη Βεσκούκη (A. Veskoukis et al., 2019). Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 4 Ελληνικές ποικιλίες οίνου, 2 ερυθρές (Ξινόμαυρο και Αγιωργίτικο) και 2 λευκές (Ασύρτικο και Μαλαγουζιά) με βάση τη δυναμικότητα στην παραγωγή, την γεωγραφική κατανομή και τις εξαγωγές τους. Για κάθε μία από τις παραπάνω ποικιλίες συγκεντρώθηκαν 8 φιάλες από διαφορετικούς παραγωγούς ή και περιοχές και έγιναν αναλύσεις *in vitro*. Με βάση τα αποτελέσματα το πιο βιοδραστικό προϊόν από κάθε ποικιλία έγινε εκχύλισμα και υποβλήθηκε εκ νέου σε έλεγχο σε *in vitro* μη κυτταρικά και κυτταρικά συστήματα. Τέλος, το εκχύλισμα της ποικιλίας του οίνου που εμφάνισε την μεγαλύτερη δράση στις περισσότερες δοκιμές που υπεβλήθη και παρουσίασε καλύτερη προστασία στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που αξιολογήθηκε, χορηγήθηκε σε πειραματόζωα με σκοπό να διαπιστωθεί η

επίδραση του σε ιστούς και όργανα ενός οργανισμού. Η μεθοδολογία του ακολουθήθηκε συνοπτικά παρουσιάζεται παρακάτω:



Εικόνα 42: Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Στα πλαίσια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής υποστηρίχθηκαν και έχουν ήδη δημοσιευθεί 9 διπλωματικές εργασίες (Γκασδρόγκα et al., 2022; Καρανίκας, 2022; Κυριαζή, 2022; Μαραβέλης, 2021; Μπεντικούγια, 2022; Ξίφτου, 2022; Παχή et al., 2021; Σαϊτή, 2022; Τσακυρίδου, 2022) και 2 άρθρα σε διεθνή έγκυρα περιοδικά με κριτές.

3 1^ο Επίπεδο αναλύσεων. Έλεγχος δειγμάτων οίνων με συνδυασμό *in vitro* τεχνικών

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

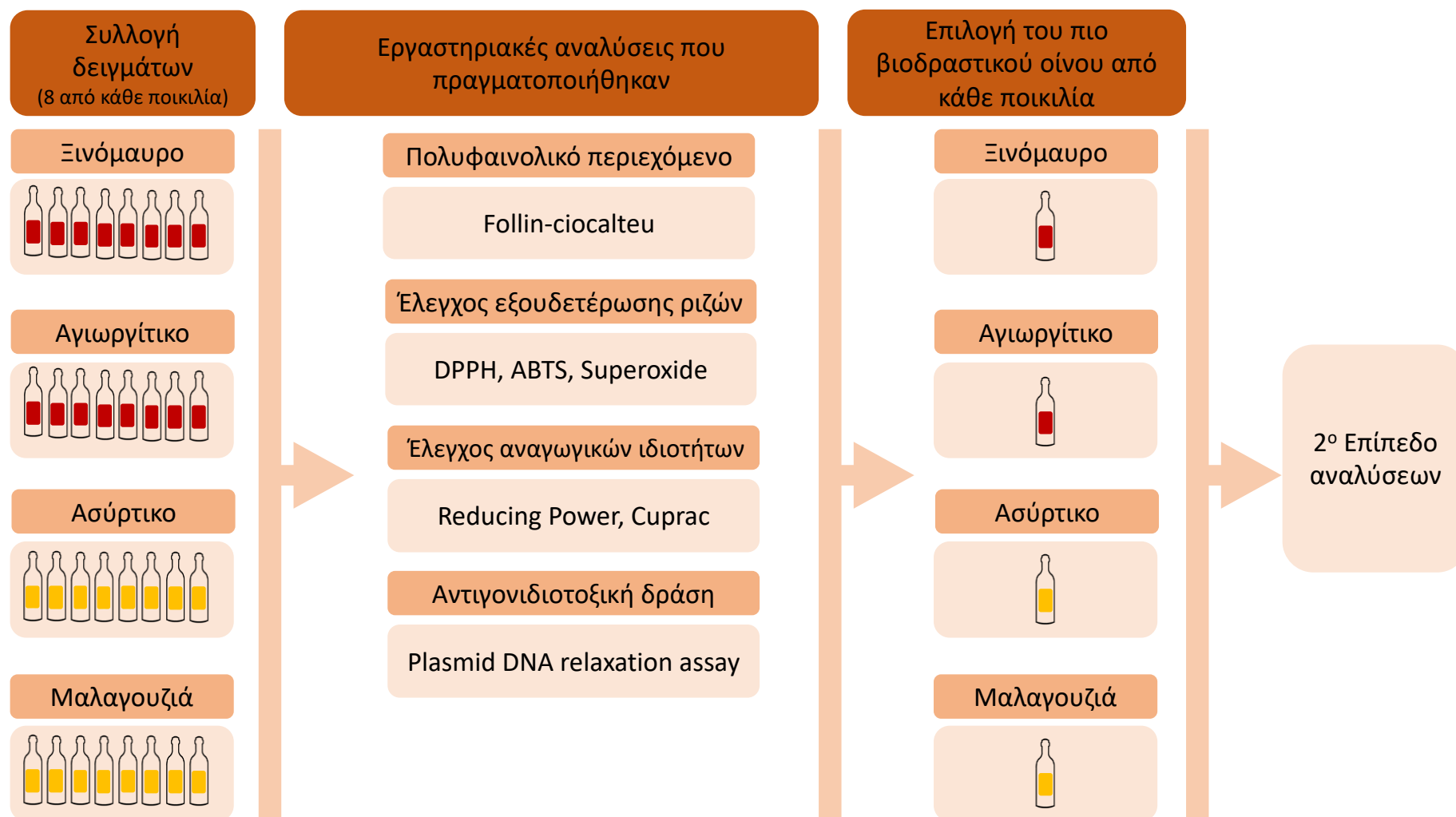
Ο πειραματικός σχεδιασμός του 1^{ου} επιπέδου αναλύσεων είχε ως στόχο να επιλεγούν οι καλύτεροι σε αντιοξειδωτικά και συνολική βιοδραστικότητα οίνοι από κάθε μία από τις υπό αξιολόγηση ποικιλίες που επιλέχθηκαν. Με σκοπό να πραγματοποιηθεί ο στόχος αυτός, πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτική αγορά 32 εμπορικών φιαλών οίνου, 8 για κάθε ποικιλία, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο, Μαλαγουζιά.

Τα δείγματα αυτά αξιολογήθηκαν με μία σειρά από *in vitro* δοκιμές που περιλάμβαναν τον έλεγχο της ικανότητας εξουδετέρωσης τόσο συνθετικών όσο και φυσικών ελευθέρων ριζών, τον έλεγχο των αναγωγικών ιδιοτήτων και την εκτίμηση της ικανότητας προστασίας του DNA από την πρόκληση οξειδωτικών βλαβών. Οι συνθετικές ρίζες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι DPPH και ABTS, ενώ δοκιμάστηκε και η ικανότητα των οίνων να εξουδετερώσουν τη φυσική ελεύθερη ρίζα Superoxide.

Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου των οίνων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ τέλος πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της αντιγονιδιοτοξικής δράσης με τη μέθοδο plasmid DNA relaxation assay.

Τα αποτελέσματα μας έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για τις ποικιλίες, ενώ έγινε και η επιλογή του ισχυρότερου δείγματος οίνου από κάθε ποικιλία με βάση τα αποτελέσματα από τις παραπάνω μεθόδους. Αυτά τα 4 δείγματα προχώρησαν στο 2^ο επίπεδο αναλύσεων.

Η γραφική απεικόνιση του 1^{ου} επιπέδου αναλύσεων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



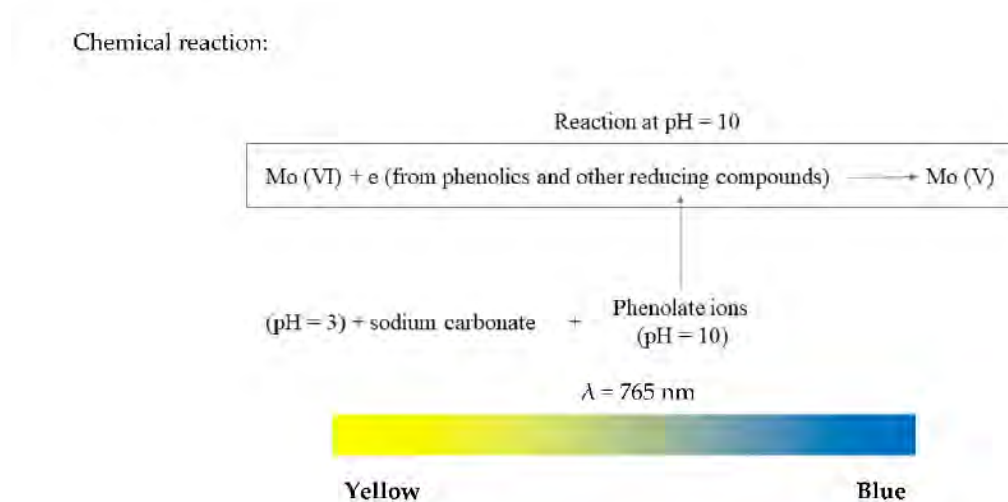
Εικόνα 43: Γραφική απεικόνιση 1^{ου} επιπέδου αναλύσεων.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

Αρχή μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη χρωματομετρία και στη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC). Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των 32 φιαλών οίνων χωρίς να διακρίνονται τα φαινολικά συστατικά μεταξύ τους. Το Folin-Ciocalteu είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων τα οποία σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε απόχρωσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων, ενώ δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και του προϊόντος της αντίδρασης. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα (Singleton et al., 1999; Veskoukis et al., 2019).



Εικόνα 44: Μέθοδος Folin- Ciocalteu (Bibi Sadeer et al., 2020).

Πειραματική διαδικασία

Πραγματοποιήθηκε η αραίωση των δειγμάτων και ακολούθησε η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Σε φιαλίδια των 2 ml προστέθηκαν οι ακόλουθοι όγκοι.

Πίνακας 3. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό του συνολικού φαιολικού φορτίου.

	Τυφλό δείγμα	Δείγμα	Αρνητικός μάρτυρας
H₂O	1020 μl	1000 μl	1100 μl
Folin-Ciocalteu	100 μl	100 μl	-
Δείγμα οίνου	-	20 μl	-
Επώαση 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου			
Na₂CO₃	280 μl	280 μl	280 μl
H₂O	600 μl	600 μl	600 μl
Υτελ.	2 ml	2 ml	2 ml

Μετά την προσθήκη των παραπάνω, ακολούθησε ανάδευση με vortex και επώαση του μείγματος για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο.

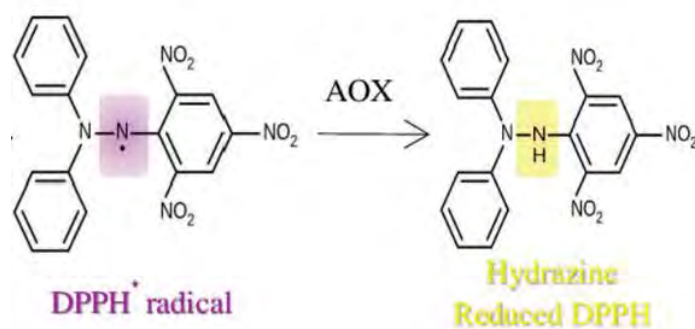
Τα δείγματα μετρήθηκαν 3 φορές. Τέλος αξιολογήθηκε και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, η οποία στη συνέχεια αφαιρέθηκε από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης.

3.2.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH[•]

Αρχή της μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη χρωματομετρία, και συγκεκριμένα στην απορρόφηση που έχει η ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Το μεθανολικό διάλυμα αυτής της ρίζας, έχει μωβ χρώμα και μετράται φασματοφωτομετρικά στα 517 nm. Εάν στο παραπάνω διάλυμα προστεθεί μια ένωση με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα DPPH[•] ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e⁻) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη, μια ουσία η οποία δίνει κίτρινο χρώμα στο διάλυμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική

απορρόφηση όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Brand-Williams et al., 1995; A. Veskoukis et al., 2019).



Εικόνα 45: Αναγωγή της ρίζας DPPH[•] σε DPPH-H και μεταβολή του χρώματος της. (Becker et al., 2019)

Πειραματική διαδικασία

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια των 1,5 ml στα οποία προστέθηκαν τα διαλύματα του παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για την μέθοδο DPPH.

	Τυφλό δείγμα	Θετικός μάρτυρας	Δείγμα	Αρνητικός μάρτυρας
Δείγμα οίνου	-	-	50 μl	50 μl
Μεθανόλη	1000 μl	950 μl	900 μl	950 μl
DPPH[•]	-	50 μl	50 μl	-
V_{τελ.}	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Με την ολοκλήρωση της προσθήκης των παραπάνω, ακολούθησε ανάδευση με vortex και επώαση τους για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Με το πέρας του παραπάνω χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομέτρηση στα 517 nm. Τέλος, καθώς η ίδια η εξεταζόμενη ουσία υπάρχει περίπτωση να απορροφά στα 517 nm πραγματοποιήθηκε και μέτρηση της απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας σε μεθανόλη. λες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

Με την παρακάτω εξίσωση υπολογίσθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα:

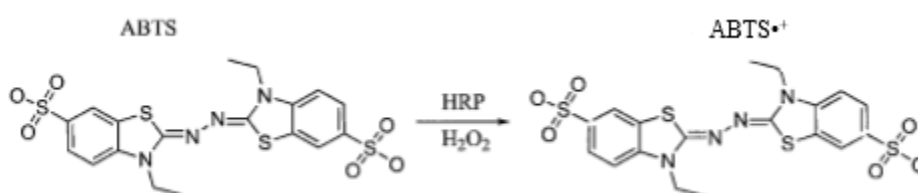
$$\% \text{ εξουδετέρωσης του DPPH} \bullet = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράστηκαν με τη μορφή IC₅₀. Πρόκειται για την απαιτούμενη συγκέντρωση για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας. Στο χαμηλότερη τιμή IC₅₀, τόσο υψηλότερη είναι η δραστηριότητα.

3.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

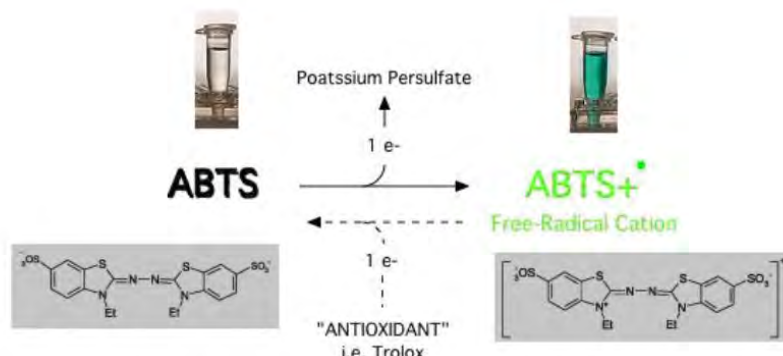
Αρχή μεθόδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην χρωματομετρία και πιο συγκεκριμένα στην εξουδετέρωση της ρίζας ABTS^{•+} από το υπό αξιολόγηση δείγμα. Η ρίζα του ABTS^{•+} παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω της δράσης της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας (όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα) (Antolovich et al., 2002; A. Veskoukis et al., 2019).



Εικόνα 46: Παραγωγή της ρίζας του ABTS^{•+} μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H₂O₂. (Johannes et al., 2006)

Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη δείγματος προς αξιολόγηση. Η ρίζα του ABTS^{•+} είναι μια ουσία η οποία φέρει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα του ABTS^{•+} ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 47: Αντίδραση αναγωγής της ρίζας ABTS^{•+} σε ABTS και αποχρωματισμός της. (Boligon, 2014)

Πειραματική διαδικασία

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια των 1,5 ml στα οποία προστέθηκαν τα διαλύματα του παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για την μέθοδο ABTS.

3x	Τυφλό δείγμα	Θετικός μάρτυρας	Δείγμα	Αρνητικός μάρτυρας
H ₂ O	450 μl	400 μl	400 μl	450 μl
ABTS (1 mM)	500 μl	500 μl	500 μl	500 μl
H ₂ O ₂ (30 μM)	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
HRP (6 μM)	-	50 μl	50 μl	-
Ντελ.	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Vortex και 45 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι				
Δείγμα οίνου	-	-	50 μl	50 μl

Μετά την προσθήκη των δειγμάτων αξιολόγησης πραγματοποιήθηκε ανάδευση με vortex και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία υπάρχει περίπτωση να απορροφά από μόνη της στα 730 nm πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του ενζύμου. λες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

Με την παρακάτω εξίσωση μπορεί να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα:

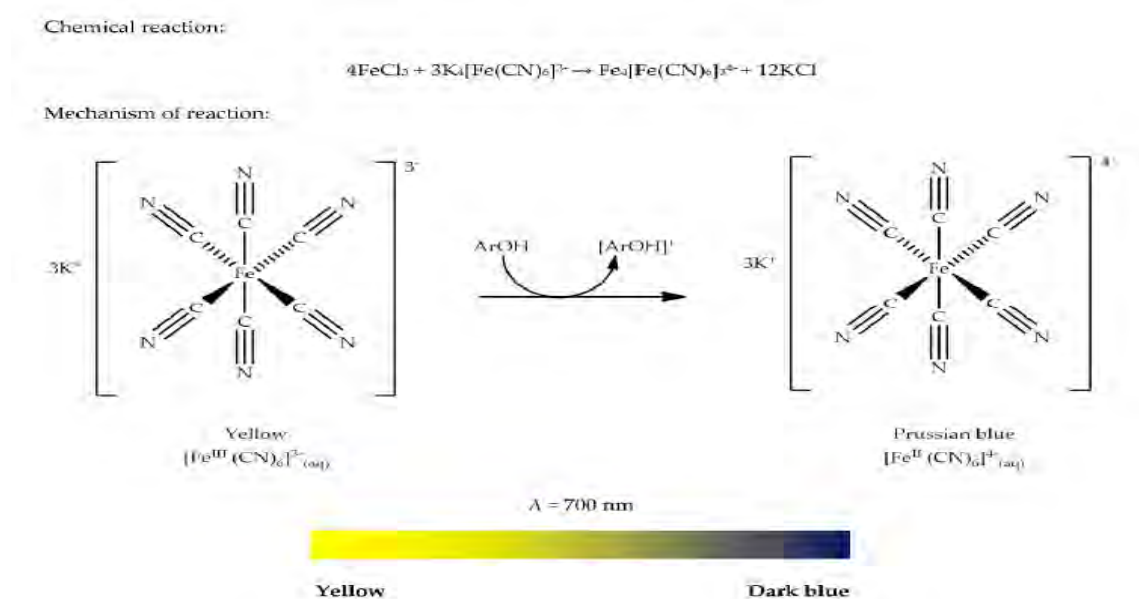
$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράστηκαν με τη μορφή IC50. Πρόκειται για την απαιτούμενη συγκέντρωση για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας. Οσο χαμηλότερη η τιμή IC50, τόσο υψηλότερη η δραστητικότητα.

3.1.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητάς τους να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή (αναγωγική ισχύς – Reducing Power).

Αρχή μεθόδου

Στη μέθοδο αυτή ουσίες που παρουσιάζουν αναγωγική ισχύ μπορούν να ανάγουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα που προκύπτουν κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση, δρώντας είτε ως πρωταρχικές ή ως δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Οι ουσίες με αναγωγική δύναμη μπορούν να ανάγουν το Fe^{3+} σε Fe^{2+} . Στη συνέχεια ο Fe^{2+} αλληλεπιδρά με το χλωριούχο σίδηρο με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου που απορροφά στα 700 nm. Το διάλυμα που αρχικά έχει κίτρινο χρώμα, ανάλογα με την αναγωγική δύναμη που διαθέτει το υπό αξιολόγηση δείγμα, μετατρέπεται σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (A. Veskoukis et al., 2019; Yen & Pin-Der, 1994).



Εικόνα 48: Αναγωγή του σιδήρου και αλλαγή χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. (Bibi Sadeer et al., 2020)

Πειραματική διαδικασία

Αφού έγιναν οι αραιώσεις των προς εξέταση εκχυλισμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, ακολούθησε η προσθήκη των αντιδραστηρίων με τη σειρά που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για την μέθοδο Reducing Power.

	Τυφλό δείγμα	Θετικός μάρτυρας	Δείγμα	Αρνητικός μάρτυρας
Δείγμα οίνου	-	-	50 μl	50 μl
Phosphate buffer (0.2M, pH 6.6)	500 μl	250 μl	200 μl	450 μl
Potassium ferricyanide	-	250 μl	250 μl	-
Επώαση στους 50 °C για 20 λεπτά				
TCA	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά				
dH ₂ O	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Ferric chloride	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Ντελ.	1000 μl	1000 μl	1000 μl	1000 μl

Μετά την προσθήκη όλων των παραπάνω, ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στο σκοτάδι και φωτομέτρηση στα 700 nm. Επειδή υπάρχει περίπτωση η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 700 nm έπρεπε να γίνει μέτρηση της απορρόφησης κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς την παρουσία του σιδηρικού ανιούχου καλίου. λες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

Ο υπολογισμός της αναγωγικής ικανότητας έγινε με την παρακάτω εξίσωση:

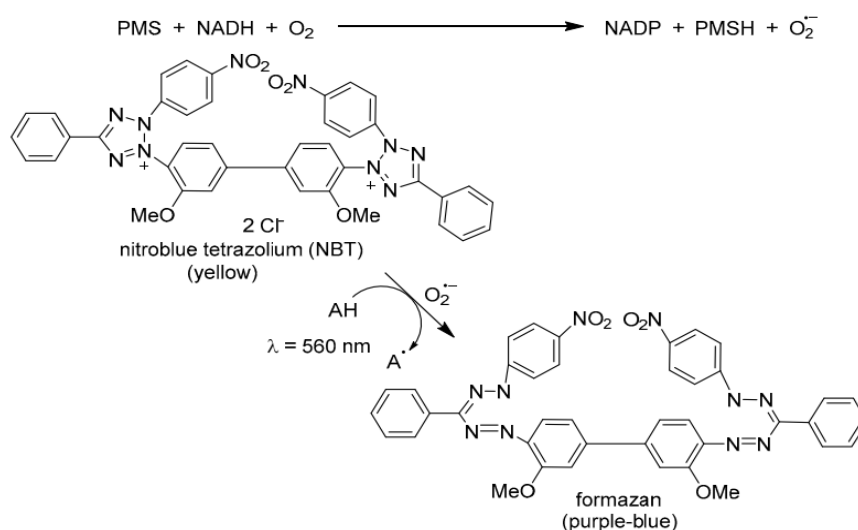
$$AU_{0,5} = A_{\delta} - A_{\circ}$$

που $A_{\delta} \rightarrow$ η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 700 nm και $A_{\circ} \rightarrow$ η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 700 nm.

3.2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\bullet-}$.

Αρχή Μεθόδου

Η ρίζα $O_2^{\bullet-}$ παράγεται ενδογενώς στους ζωντανούς οργανισμούς. Στη συγκεκριμένη δοκιμή η ρίζα προέρχεται από τα συστήματα PMS - NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύεται μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\bullet-}$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT^{2+} με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Gülçin et al., 2004; A. Veskoukis et al., 2019).



Εικόνα 49. Η μετατροπή του NBT σε φορμαζάνη μέσα από το σύστημα PMS-NADH. (Santos & Silva, 2020)

Πειραματική διαδικασία

Αφού έγιναν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολούθησε η προσθήκη των διαλυμάτων. Σε 625 μl Tris-HCl προστέθηκαν 125 μl NBT, 125 μl NADH και 50 μl δείγματος όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 125 μl PMS στο μείγμα.

Πίνακας 7. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για την εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$.

	Τυφλό δείγμα	Θετικός μάρτυρας	Δείγμα	Αρνητικός μάρτυρας
Δείγμα οίνου	-	-	50 μ l	50 μ l
dH ₂ O	-	50 μ l	-	-
Tris-HCl (16mM, pH 8.0)	800 μ l	625 μ l	625 μ l	750 μ l
NBT (300 μ M)	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l
NADH (468 μ M)	125 μ l	125 μ l	125 μ l	125 μ l
PMS (60 μ M)	-	125 μ l	125 μ l	-
Υτελ.	1050 μ l	1050 μ l	1050 μ l	1050 μ l

Τα δείγματα επωάσθηκαν για 5 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 560 nm. Μειωμένη απορρόφηση σημαίνει αυξημένη δραστικότητα εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας. Τα δείγματα χωρίς PMS αποτέλεσαν το τυφλό δείγμα. Τέλος, επειδή η ίδια η εξεταζόμενη ουσία υπάρχει περίπτωση να απορροφά στα 560 nm έπρεπε να μετρηθεί και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης χωρίς τη προσθήκη PMS. Άρα οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως εξής:

$$\%RSC = \frac{\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}}{\text{απορρόφηση control}} \times 100$$

RSC = radical scavenging capacity

Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράσθηκαν με τη μορφή IC₅₀. Πρόκειται για την απαιτούμενη συγκέντρωση για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας. Όσο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀, τόσο υψηλότερη η δραστικότητα.

3.2.5 Επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Αρχή της μεθόδου

Η συγκεκριμένη αξιολόγηση χρησιμοποιείται με σκοπό την παρατήρηση και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των οίνων απέναντι στην επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA από ROS. Το πλασμίδιο είναι ένα κυκλικό μόριο DNA μικρού μεγέθους, το οποίο μπορεί να απομονωθεί εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στο πλεονέκτημα που φέρει το πλασμιδιακό DNA, να εμφανίζει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με το βαθμό υπερελίκωσής του, κατά την ηλεκτροφόρησή του σε gel αгарόζης. Οι διαμορφώσεις αυτές είναι:

- ❖ Η υπερελικομένη διαμόρφωση (supercoiled conformation), στην οποία το πλασμιδιακό DNA δεν έχει θραύσματα και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
- ❖ Η ανοιχτή κυκλική (open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλωνα σπασίματα από παράγοντες όπως οι ελεύθερες ρίζες .
- ❖ Η γραμμική διαμόρφωση (linear conformation) η οποία δημιουργείται όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο γρήγορα και εύκολα διαπερνά τους πόρους στο gel αгарόζης. Επομένως η υπερελικομένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική, με την πρώτη να εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αгарόζης (S. T. Chang et al., 2001; A. Veskoukis et al., 2019).

Πειραματική διαδικασία

- ❖ Ορισμός της συγκέντρωσης της ρίζας στην οποία κόβεται το πλασμιδιακό DNA
- ❖ Προετοιμασία του gel αгарόζης 0.8% σε TBE 1x
- ❖ Αραίωση των δειγμάτων
- ❖ Προσθήκη των διαλυμάτων που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 8. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της προστασίας του DNA.

	Αρνητικός μάρτυρας	Θετικός μάρτυρας	Δείγμα	Μέγιστη συγκέντρωση
PBS	8 μl	4 μl	1 μl	5 μl
Δείγμα οίνου	-	-	3 μl	3 μl
DNA	2μl (εξαρτάται από την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA)			
AAPH	-	4μl (εξαρτάται από την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA)		-
Ντελ.	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

- ❖ Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- ❖ Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά
- ❖ Προσθήκη 3 μl loading buffer
- ❖ Ανάδευση (spin-vortex-spin)
- ❖ Ηλεκτροφόρηση στα 70 V για περίπου 1 ώρα (σε gel αгарόζης 0,8%)
- ❖ Χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο για 30 λεπτά
- ❖ Πλύση με H₂O για 30 λεπτά
- ❖ Φωτογραφία-Ποσοτικοποίηση

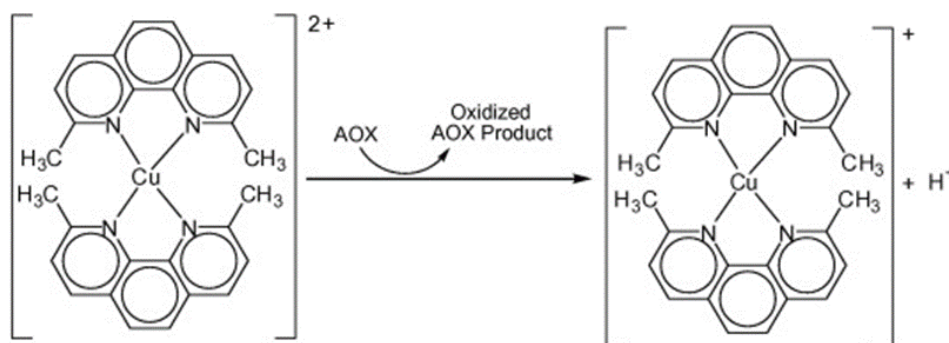
Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράστηκαν ως IC₅₀. Πρόκειται για την απαιτούμενη συγκέντρωση για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας. Σο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀, τόσο υψηλότερη η δραστικότητα.

3.2.6 Εκτίμηση αναγωγικής ικανότητας έναντι του χαλκού (CUPRAC Assay)

Αρχή μεθόδου

Η αναγωγική ισχύς μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της δράση, καθώς αντιοξειδωτικές ουσίες αποτελούν δότες ηλεκτρονίων, ανάγοντας τα προϊόντα

οξειδωσης των ελεύθερων ριζών. Η μέθοδος αυτή αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη αναγωγικής ικανότητας πλήθους εκχυλισμάτων και δειγμάτων. Η μέθοδος εκτίμησης της αναγωγικής ικανότητας στο χαλκό αξιολογεί την ικανότητα ενός δείγματος να ανάγει τα ιόντα Cu^{2+} σε Cu^{1+} , παρουσία ενός χηλικού παράγοντα. Η νεοκουπροΐνη (Nc; 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) αποτελεί το συνηθέστερο χηλικό παράγοντα της μεθόδου. Η αναγωγική ικανότητα των εκχυλισμάτων εκτιμάται μέσω της αναγωγής του συμπλόκου CUPRAC (Nc- CuCl_2 - NH_4Ac) (Munteanu & Apetrei, 2021).



Εικόνα 50. Αναγωγή του συμπλόκου CUPRAC παρουσία Nc, μετά από αλληλεπίδραση με το εξεταζόμενο δείγμα (Munteanu & Apetrei, 2021)

Πειραματική διαδικασία

Αφού έγιναν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολούθησε η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για την μέθοδο Cuprac Assay.

	Τυφλό δείγμα	Θετικός μάρτυρας	Δείγμα	Αρνητικός μάρτυρας
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Nc	-	250 μl	250 μl	-
NH_4Ac	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl
Δείγμα οίνου	-	-	50 μl	525 μl
dH_2O	525 μl	275 μl	225 μl	-
Ντελ	1025 μl	1025 μl	1025 μl	1025 μl

ταν προστέθηκε και το δείγμα, ακολούθησε ανάδευση και επώαση για 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι. Τέλος, το διάλυμα φωτομετρήθηκε στα 450 nm. Τα δείγματα χωρίς Νc αποτέλεσαν το τυφλό. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της απορρόφησης μόνο της εξεταζόμενης ουσίας σε κάθε συγκέντρωση στα 450 nm. λες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

Ο υπολογισμός της αναγωγικής ικανότητας έγινε με την παρακάτω εξίσωση:

$$AU_{0,5} = A_{\delta} - A_o$$

που $A_{\delta} \rightarrow$ η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 450 nm και $A_o \rightarrow$ η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 450 nm.

3.2.7 Στατιστική ανάλυση

Για τη σύγκριση των διαφορετικών ποικιλιών οίνου στις μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης, τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση one-way ANOVA ακολουθούμενο από τη δοκιμή Holm-Sidak's για πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων. Για την ανάλυση έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism (έκδοση GraphPad Prism 9.0.0). λα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (SEM) και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Για τη σύγκριση της επίδρασης του χρώματος στις μεθόδους εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης, τα δεδομένα αναλύθηκαν μέσω μη παραμετρικού t-test χρησιμοποιώντας την δοκιμή Mann-Whitney test. Για την ανάλυση έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad Prism (έκδοση GraphPad Prism 9.0.0). λα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Για τον έλεγχο της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης των κρασιών με το πολυφαινολικό περιεχόμενο αυτών πραγματοποιήθηκε Pearson R δοκιμή συσχέτισης. Για την ανάλυση έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad

Prism (έκδοση GraphPad Prism 9.0.0). Οι συσχετίσεις θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

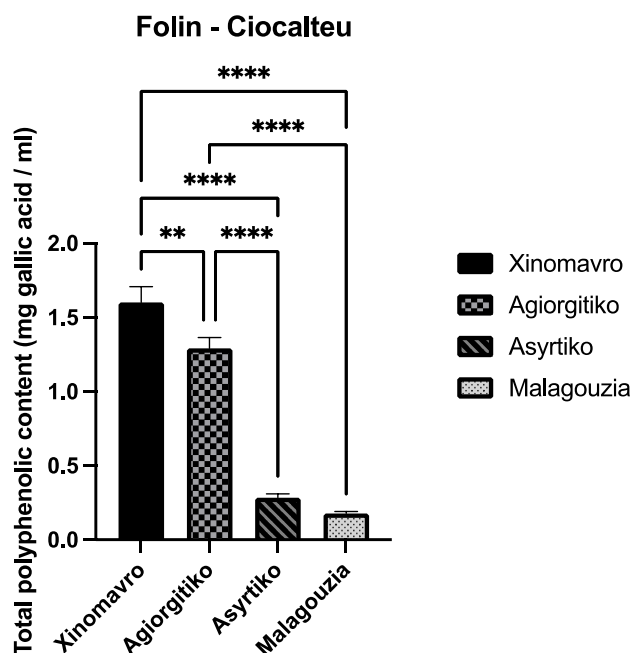
3.2 Αποτελέσματα

3.2.1 Πολυφαινολικό περιεχόμενο

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 4 ποικιλιών οίνων ως προς το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Το πιο πλούσιο, σε πολυφαινολικό περιεχόμενο, Ξινόμαυρο ήταν το δείγμα 1, από τα δείγματα Αγιωργίτικου ήταν το δείγμα 3, από τα Ασύρτικα ήταν το δείγμα 4 και από τα δείγματα Μαλαγουζιάς ήταν το δείγμα 1.

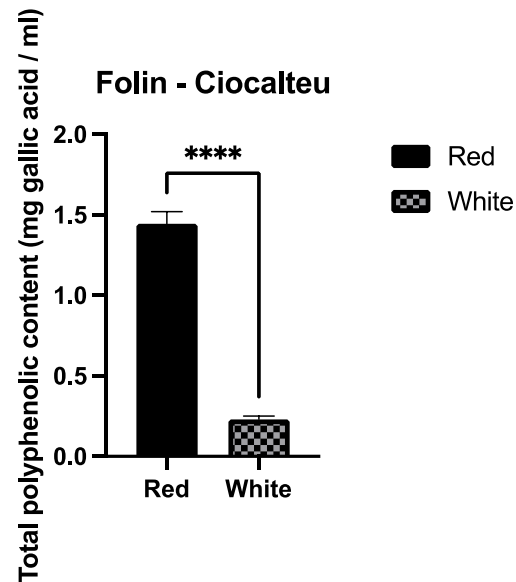
Folin-Ciocalteu (μl GAE/ml)								
	Ξινόμαυρο		Αγιωργίτικο		Ασύρτικο		Μαλαγουζιά	
	mean	sem	mean	sem	mean	sem	mean	sem
Δείγμα 1	1,922	0,067	1,341	0,027	0,222	0,008	0,222	0,001
Δείγμα 2	1,173	0,016	1,257	0,062	0,249	0,001	0,199	0,001
Δείγμα 3	1,670	0,002	1,593	0,042	0,201	0,006	0,113	0,010
Δείγμα 4	1,878	0,032	1,569	0,032	0,383	0,019	0,216	0,007
Δείγμα 5	1,501	0,015	1,247	0,011	0,381	0,001	0,146	0,005
Δείγμα 6	1,828	0,007	1,216	0,069	0,240	0,001	0,175	0,003
Δείγμα 7	1,682	0,011	1,096	0,007	0,330	0,030	0,165	0,004
Δείγμα 8	1,160	0,015	1,010	0,007	0,269	0,006	0,186	0,001

Από τη συγκριτική ανάλυση των τεσσάρων ποικιλιών οίνων, φάνηκε ότι οι δύο ερυθροί έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τους δύο λευκούς, ενώ το Ξινόμαυρο έχει στατιστικά σημαντική διαφορά και από το Αγιωργίτικο όπως παρουσιάζεται στην διπλανή εικόνα.



Εικόνα 51: Συγκριτική ανάλυση των 4 ποικιλιών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$), **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Επιπλέον, όσον αφορά τη σύγκριση των ερυθρών με τους λευκούς οίνους, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ειδών οίνου με $p < 0,0001$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 52: Συγκριτική ανάλυση των ερυθρών και λευκών οίνων ως προς το πολυφαινολικό περιεχόμενο. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

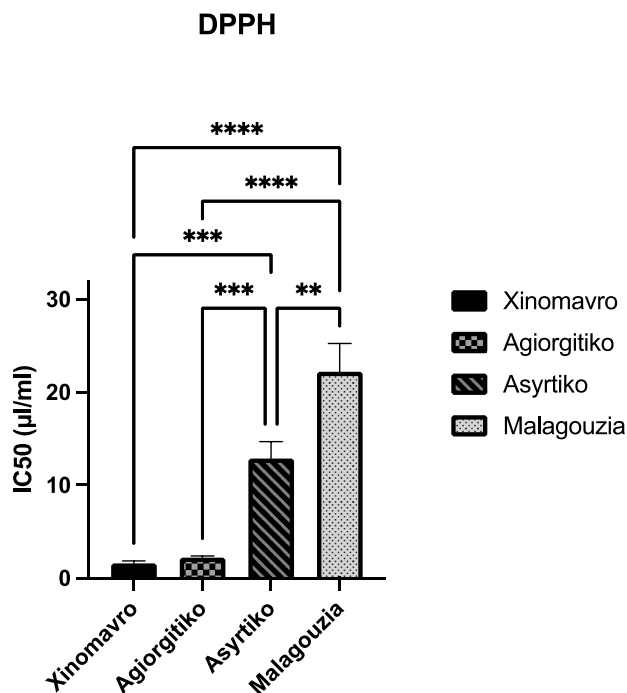
3.2.2 Εκτίμηση της ικανότητας των προς μελέτη δειγμάτων να ανάγουν την ελεύθερη ρίζα DPPH

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 4 ποικιλιών οίνων με τη μέθοδο DPPH παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Ο ισχυρότερος οίνος της ποικιλίας Ξινόμαυρο ήταν το δείγμα 1, της ποικιλίας Αγιωργίτικο το δείγμα 7, της ποικιλίας Ασύρτικο το δείγμα 4 και το ισχυρότερο της ποικιλίας Μαλαγουζιά ήταν το δείγμα 2.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των κρασιών με την μέθοδο DPPH.

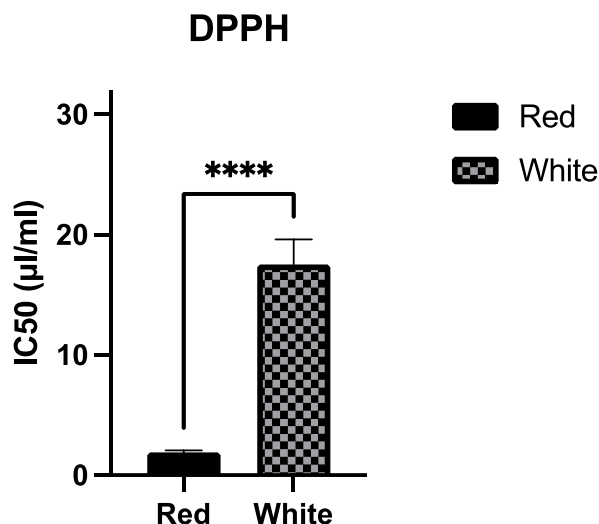
DPPH (IC50 μ l/ml)								
	Ξινόμαυρο		Αγιωργίτικο		Ασύρτικο		Μαλαγουζιά	
	mean	sem	mean	sem	mean	sem	mean	sem
Δείγμα 1	0,916	0,024	1,816	0,137	19,389	0,680	19,035	0,311
Δείγμα 2	1,725	0,089	2,101	0,073	15,864	1,226	16,005	0,718
Δείγμα 3	1,338	0,017	1,905	0,098	18,770	0,783	29,124	2,002
Δείγμα 4	3,278	0,006	2,020	0,006	4,160	0,115	40,946	3,048
Δείγμα 5	1,378	0,074	3,279	0,137	8,654	0,334	16,448	1,419
Δείγμα 6	1,155	0,043	2,435	0,017	11,686	0,378	19,099	0,354
Δείγμα 7	1,213	0,033	1,742	0,044	12,882	0,209	17,633	0,223
Δείγμα 8	1,721	0,063	2,384	0,028	11,522	0,067	19,296	0,040

Από τη σύγκριση των 4 ποικιλιών οίνων, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά φάνηκε ότι οι δύο ερυθροί έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τους δύο λευκούς, ενώ και το Ασύρτικο είναι στατιστικά πιο ισχυρό από την Μαλαγουζιά όπως παρουσιάζεται στην διπλανή εικόνα.



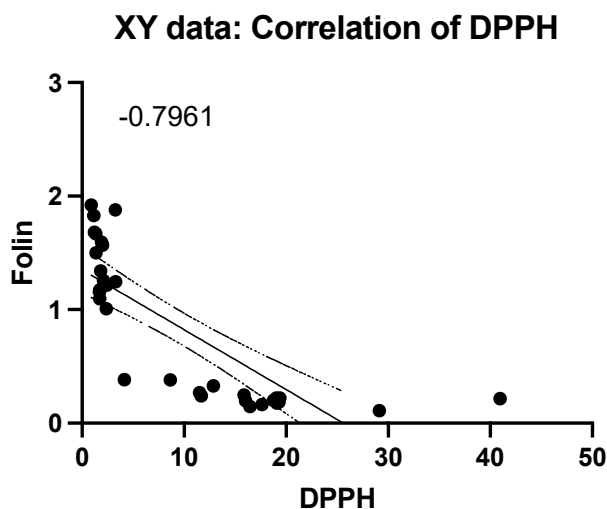
Εικόνα 53: Συγκριτική ανάλυση των 4 ποικιλιών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$), *** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$), **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Επιπλέον, όσον αφορά την σύγκριση των ερυθρών με τους λευκούς οίνους, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ειδών οίνου με $p < 0,0001$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 54: Συγκριτική ανάλυση των ερυθρών και λευκών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Τέλος, μετά την ανάλυση της συσχέτισης των τιμών DPPH με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($-0,7961$, $p < 0,0001$), που σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες τόσο μειώνεται το IC50 υποδηλώνοντας ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 55: Ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 ($-0,7961$ $p < 0,0001$)

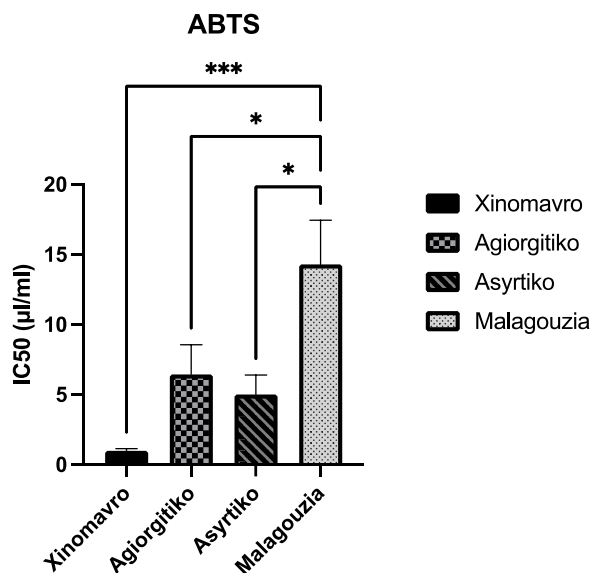
3.2.3 Εκτίμηση της ικανότητας των προς μελέτη δειγμάτων να ανάγουν την ελεύθερη ρίζα ABTS

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 4 ποικιλιών οίνων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Το ισχυρότερο Ξινόμαυρο ήταν το δείγμα 1, το ισχυρότερο Αγιωργίτικο ήταν το δείγμα 3, το ισχυρότερο Ασύρτικο ήταν το 4 και το ισχυρότερο από τα δείγματα Μαλαγουζιάς ήταν το δείγμα 2.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των κρασιών με την μέθοδο ABTS.

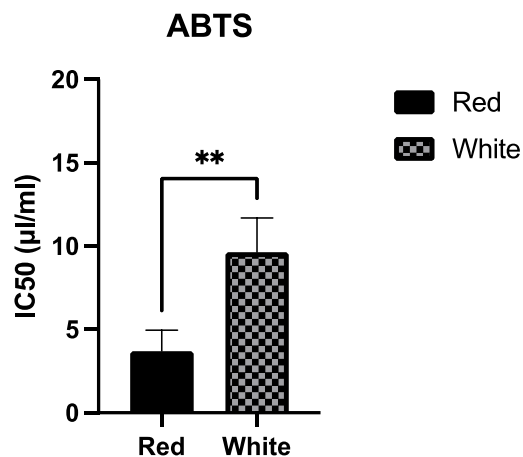
ABTS (IC50 μ l/ml)								
	Ξινόμαυρο		Αγιωργίτικο		Ασύρτικο		Μαλαγουζιά	
	mean	sem	mean	sem	mean	sem	mean	sem
Δείγμα 1	0,387	0,001	15,398	1,007	4,723	0,187	12,699	0,260
Δείγμα 2	0,677	0,018	1,816	0,012	2,528	0,242	2,565	0,011
Δείγμα 3	0,941	0,029	0,877	0,039	11,567	0,480	29,349	1,918
Δείγμα 4	1,375	0,157	0,893	0,025	0,895	0,122	10,984	0,270
Δείγμα 5	0,688	0,059	3,657	0,199	3,002	0,119	3,899	0,352
Δείγμα 6	0,845	0,037	4,657	0,199	3,284	0,264	19,800	0,054
Δείγμα 7	1,248	0,038	9,722	0,132	3,401	0,211	20,445	0,033
Δείγμα 8	1,720	0,025	14,509	0,054	10,634	0,222	14,602	0,143

Από τη σύγκριση των 4 ποικιλιών οίνων, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά φάνηκε ότι οι δύο ερυθροί οίνοι έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με την ποικιλία Μαλαγουζιά ενώ και το Ασύρτικο είναι στατιστικά πιο ισχυρό από την ποικιλία της Μαλαγουζιάς όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 56.



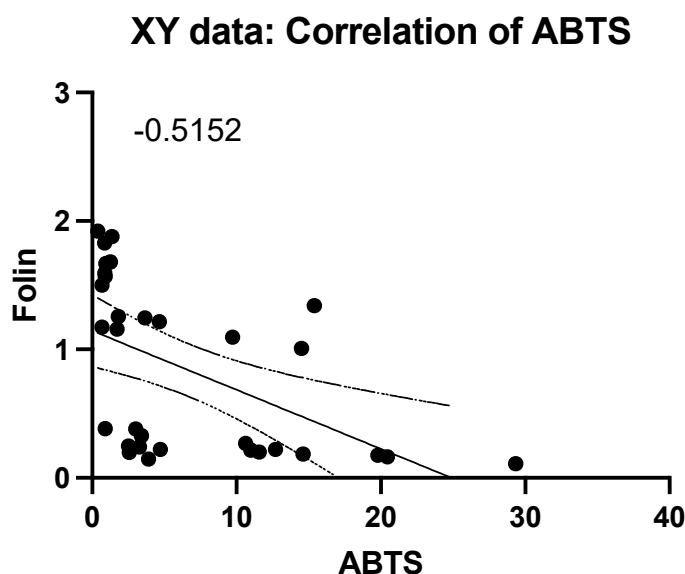
Εικόνα 56: Συγκριτική ανάλυση των 4 ποικιλιών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$), *** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$).

Επιπλέον όσον αφορά την σύγκριση των ερυθρών με τους λευκούς οίνους, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ειδών οίνου με $p < 0,01$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 57: Συγκριτική ανάλυση των ερυθρών και λευκών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$).

Τέλος, μετά την ανάλυση της συσχέτισης των τιμών ABTS με την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση ($-0,5152$ $p < 0,01$), που σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες τόσο μειώνεται το IC50 υποδηλώνοντας ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 58: Ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 ($-0,5152$ $p < 0,01$).

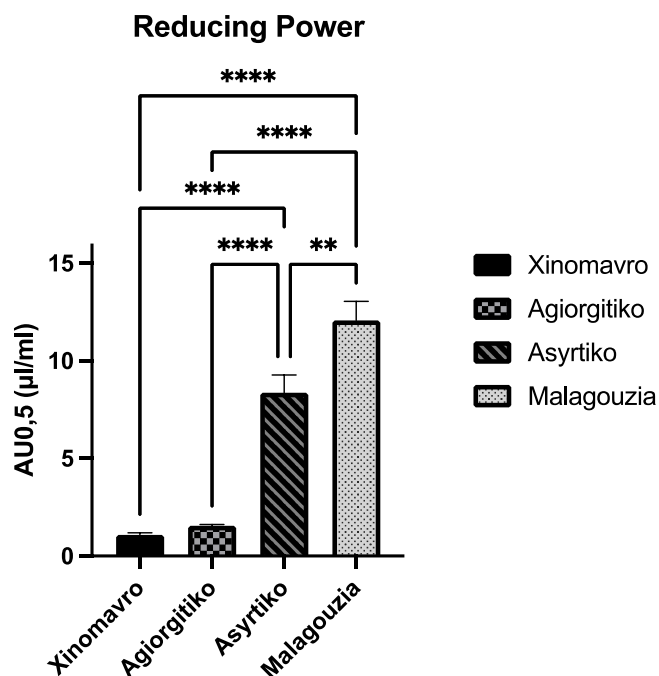
3.2.4 Εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας των προς μελέτη δειγμάτων (Reducing Power)

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 4 ποικιλιών οίνων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Το ισχυρότερο Ξινόμαυρο ήταν το δείγμα 1, το ισχυρότερο Αγιωργίτικο ήταν το δείγμα 3, το ισχυρότερο Ασύρτικο ήταν το 4 και το ισχυρότερο από τα δείγματα Μαλαγουζιάς ήταν το δείγμα 2.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των κρασιών με την μέθοδο Reducing Power.

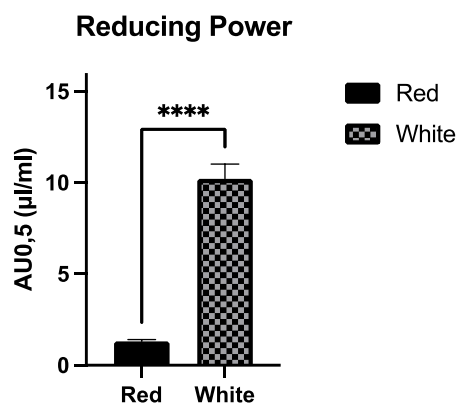
R.P. (AU0.5 μ l/ml)								
	Ξινόμαυρο		Αγιωργίτικο		Ασύρτικο		Μαλαγουζιά	
	mean	sem	mean	sem	mean	sem	mean	sem
Δείγμα 1	0,611	0,001	1,480	0,030	10,902	0,145	9,630	0,050
Δείγμα 2	0,879	0,004	1,490	0,010	7,685	0,275	9,180	0,040
Δείγμα 3	1,163	0,019	1,235	0,005	9,685	0,075	16,860	0,100
Δείγμα 4	1,550	0,020	1,365	0,025	5,425	0,095	9,775	0,045
Δείγμα 5	1,305	0,005	1,858	0,011	5,570	0,050	11,967	0,361
Δείγμα 6	0,962	0,012	1,730	0,015	8,336	0,201	10,855	0,001
Δείγμα 7	1,127	0,024	1,777	0,079	6,647	0,270	14,488	0,075
Δείγμα 8	1,130	0,016	1,445	0,033	12,634	0,222	13,865	0,009

Από τη σύγκριση των 4 ποικιλιών οίνων, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά φάνηκε ότι οι 2 ερυθροί έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τους 2 λευκούς, ενώ και το Ασύρτικο είναι στατιστικά πιο ισχυρό από την Μαλαγουζιά όπως παρουσιάζεται στην διπλανή εικόνα.



Εικόνα 59: Συγκριτική ανάλυση των 4 ποικιλιών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$), *** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$), **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

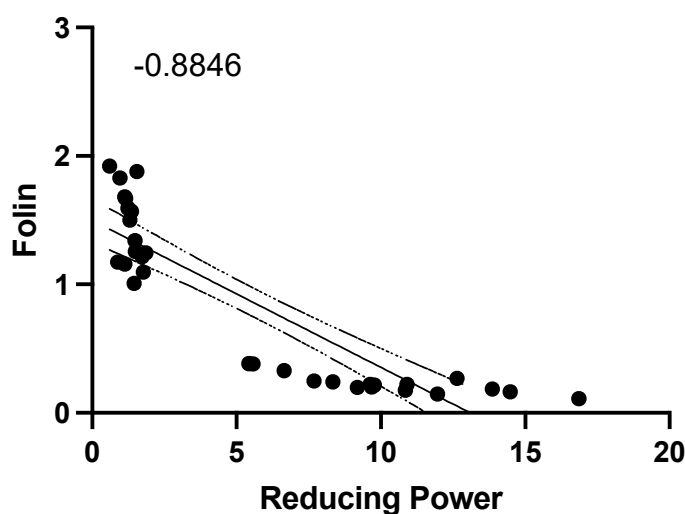
Επιπλέον όσον αφορά την σύγκριση των ερυθρών με τους λευκούς οίνους, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ειδών οίνου με $p < 0,0001$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 60: Συγκριτική ανάλυση των ερυθρών και λευκών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Τέλος, μετά την ανάλυση της συσχέτισης των τιμών από το Reducing Power με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($-0,8846$ $p < 0,0001$), που αυτό σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες τόσο μειώνεται το AU0.5 υποδηλώνοντας ισχυρότερη αναγωγική ισχύ και άρα ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

XY data: Correlation of Reducing Power



Εικόνα 61: Ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του AU0.5 ($-0,8846$ $p < 0,0001$).

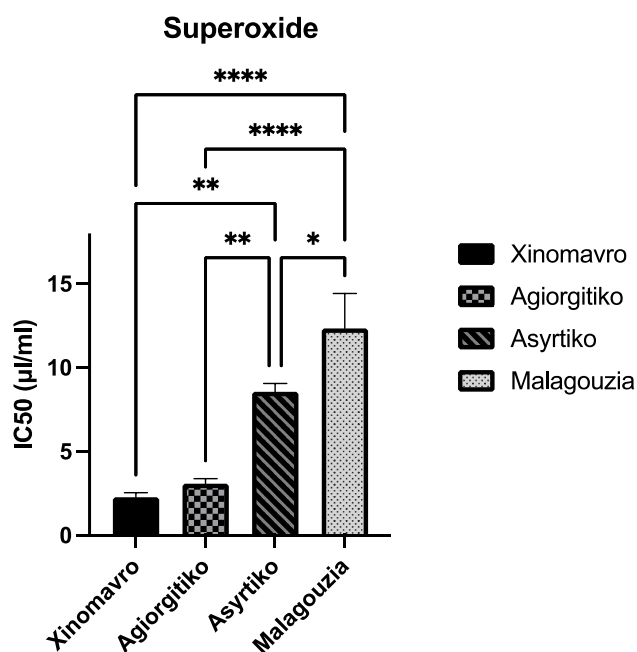
3.2.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτική ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$.

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 4 ποικιλιών οίνων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Το ισχυρότερο Ξινόμαυρο ήταν το δείγμα 1, το ισχυρότερο Αγιωργίτικο ήταν το δείγμα 3, το ισχυρότερο Ασύρτικο ήταν το δείγμα 4 και το ισχυρότερο από τα δείγματα Μαλαγουζιάς ήταν το δείγμα 1.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των κρασιών με την μέθοδο Superoxide Radical Scavenging.

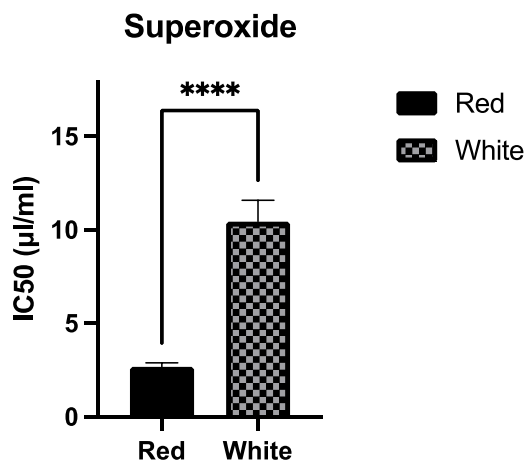
$O_2^{\cdot-}$ (IC50 μ l/ml)								
	Ξινόμαυρο		Αγιωργίτικο		Ασύρτικο		Μαλαγουζιά	
	mean	sem	mean	sem	mean	sem	mean	sem
Δείγμα 1	1,212	0,313	2,440	0,259	10,194	0,882	5,237	0,390
Δείγμα 2	3,310	0,670	2,317	0,161	9,129	0,424	9,554	0,856
Δείγμα 3	2,988	0,343	2,119	0,201	9,685	0,489	19,803	0,211
Δείγμα 4	1,401	0,021	4,194	0,455	5,804	0,849	5,595	0,011
Δείγμα 5	1,893	0,804	3,162	0,017	7,118	0,569	16,483	0,451
Δείγμα 6	2,406	0,280	2,974	0,011	8,824	0,022	17,871	0,026
Δείγμα 7	2,352	0,057	4,445	0,033	8,954	0,210	16,270	0,145
Δείγμα 8	2,653	0,201	2,953	0,028	8,695	0,150	7,910	0,054

Από τη σύγκριση των 4 ποικιλιών οίνων, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά φάνηκε ότι οι 2 ερυθροί έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τους 2 λευκούς, ενώ και το Ασύρτικο είναι στατιστικά πιο ισχυρό από την Μαλαγουζιά όπως παρουσιάζεται στην διπλανή εικόνα.



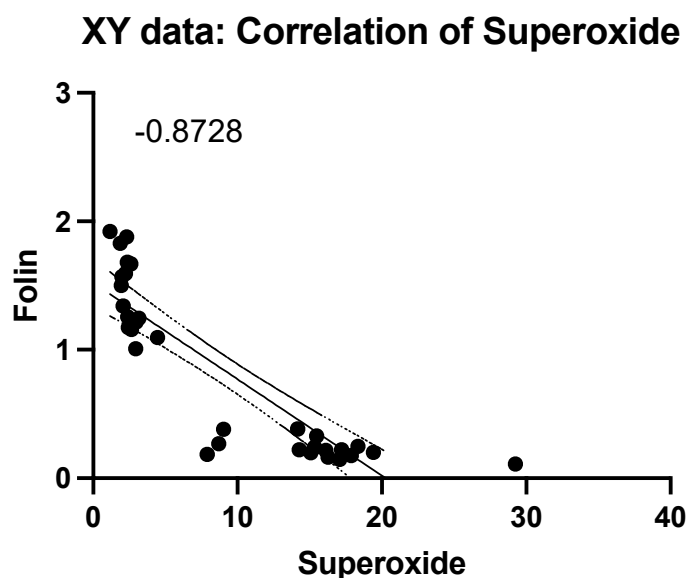
Εικόνα 62: Συγκριτική ανάλυση των 4 ποικιλιών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$), *** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$), **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Επιπλέον όσον αφορά τη σύγκριση των ερυθρών με τους λευκούς οίνους, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ειδών οίνου με $p < 0,0001$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 63: Συγκριτική ανάλυση των ερυθρών και λευκών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Τέλος, μετά την ανάλυση της συσχέτισης των τιμών του Superoxide Radical Scavenging με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($-0,8728$ $p < 0,0001$), που σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες τόσο μειώνεται το IC50 υποδηλώνοντας ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 64: Ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 ($-0,8728$ $p < 0,0001$).

3.2.6 Έλεγχος προστασίας από επαγόμενη από τις ρίζες περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

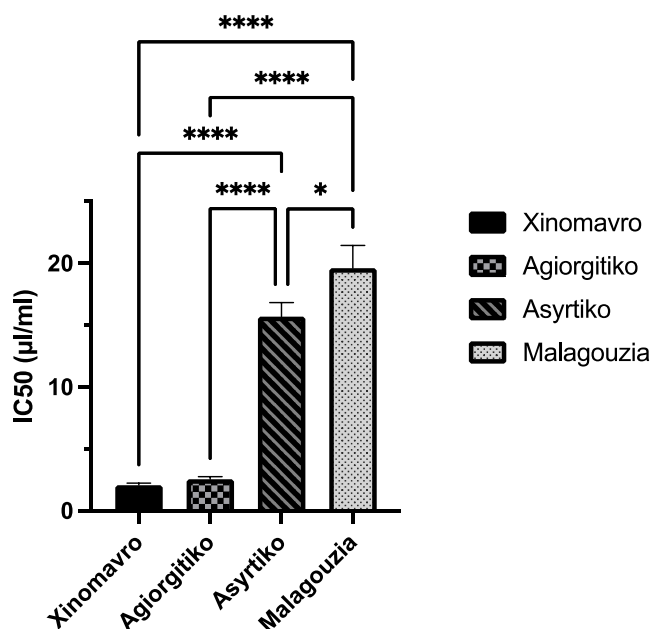
Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 4 ποικιλιών οίνων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Το ισχυρότερο Ξινόμαυρο ήταν το δείγμα 1, το ισχυρότερο Αγιωργίτικο ήταν το δείγμα 4, το ισχυρότερο Ασύρτικο ήταν το δείγμα 5 και το ισχυρότερο από τα δείγματα Μαλαγουζιάς ήταν το δείγμα 1.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των κρασιών με την μέθοδο Plasmid DNA Relaxation Assay.

ROO• (IC50 μ l/ml)								
	Ξινόμαυρο		Αγιωργίτικο		Ασύρτικο		Μαλαγουζιά	
	mean	sem	mean	sem	mean	sem	mean	sem
Δείγμα 1	1,163	0,013	2,076	0,067	17,209	1,102	14,277	0,144
Δείγμα 2	2,432	0,163	2,391	0,049	18,350	0,562	15,075	0,452
Δείγμα 3	2,618	0,024	2,230	0,080	19,415	0,279	29,262	0,009
Δείγμα 4	2,318	0,015	1,990	0,010	14,173	0,348	16,131	0,137
Δείγμα 5	1,946	0,025	2,006	0,008	9,032	0,010	17,087	0,642
Δείγμα 6	1,885	0,029	3,660	0,035	15,355	0,123	23,918	0,047
Δείγμα 7	2,376	0,008	3,161	0,013	15,476	0,345	22,400	0,015
Δείγμα 8	1,885	0,011	2,865	0,009	16,605	0,351	18,801	0,055

Plasmid DNA Relaxation Assay

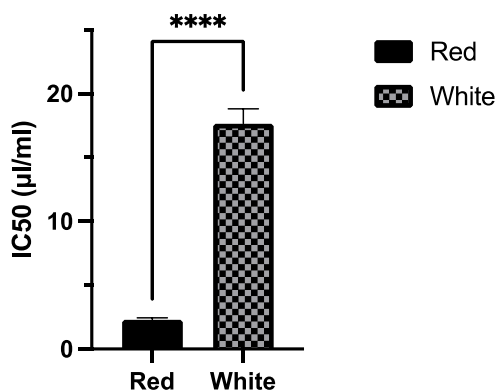
Από τη σύγκριση των 4 ποικιλιών οίνων, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά φάνηκε ότι οι 2 ερυθροί έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τους 2 λευκούς, ενώ και το Ασύρτικο είναι στατιστικά πιο ισχυρό από την Μαλαγουζιά όπως παρουσιάζεται στην διπλανή εικόνα.



Εικόνα 65: Συγκριτική ανάλυση των 4 ποικιλιών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. * στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$), ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$), *** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$), **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Επιπλέον όσον αφορά την σύγκριση των ερυθρών με τους λευκούς οίνους, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ειδών οίνου με $p < 0,0001$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.

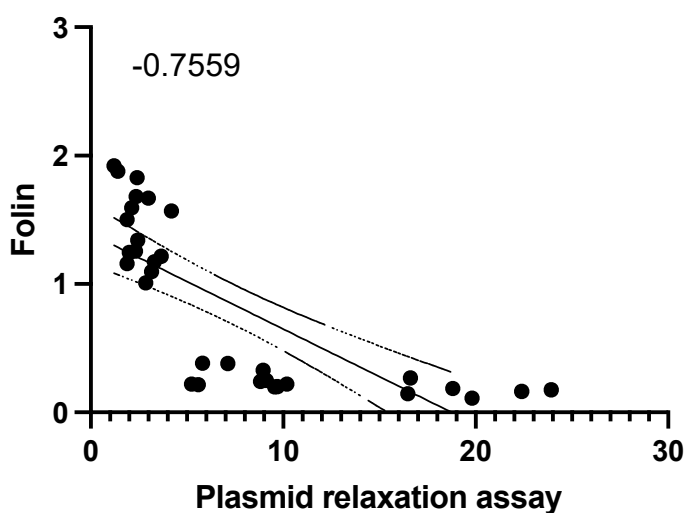
Plasmid DNA Relaxation Assay



Εικόνα 66: Συγκριτική ανάλυση των ερυθρών και λευκών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Τέλος, μετά την ανάλυση της συσχέτισης των τιμών του Plasmid relaxation assay με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($-0,7559$, $p < 0,0001$), που αυτό σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες τόσο μειώνεται το IC50 υποδηλώνοντας ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

XY data: Correlation of Plasmid relaxation assay



Εικόνα 67: Ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του IC50 ($-0,7559$, $p < 0,0001$).

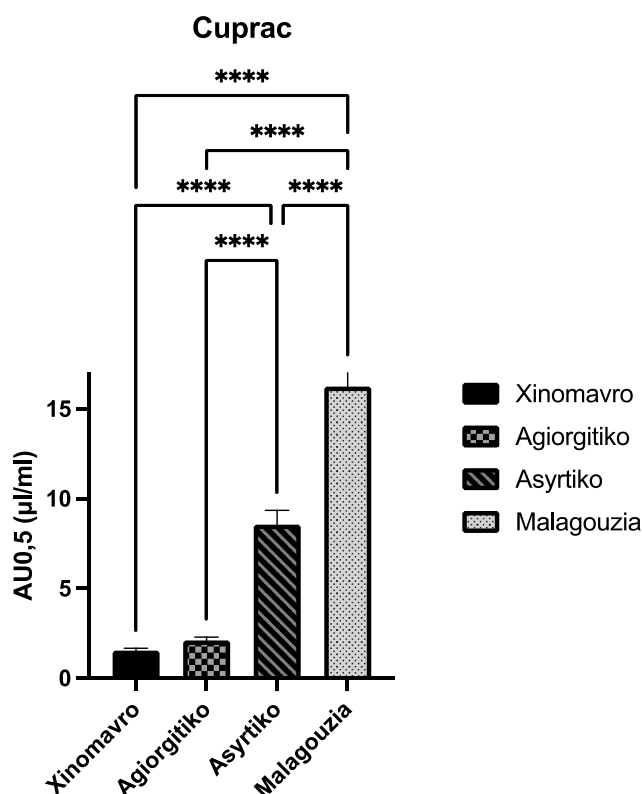
3.2.7 Εκτίμηση αναγωγικής ικανότητας έναντι του χαλκού (CUPRAC Assay)

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των 4 ποικιλιών οίνων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Το ισχυρότερο Ξινόμαυρο ήταν το δείγμα 1, το ισχυρότερο Αγιωργίτικο ήταν το δείγμα 2, το ισχυρότερο Ασύρτικο ήταν το δείγμα 4, όπως και από τα δείγματα Μαλαγουζιάς.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα από την αξιολόγηση των κρασιών με την μέθοδο CUPRAC.

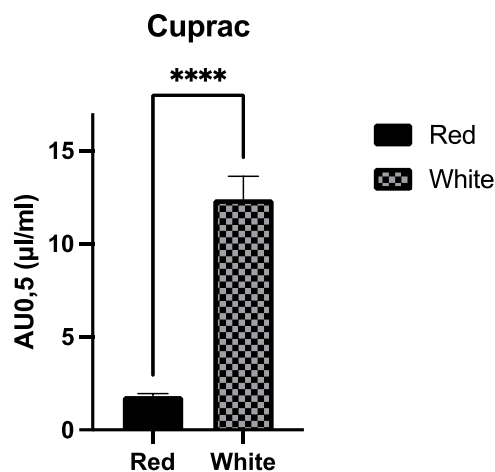
CUPRAC (AU _{0.5} µl/ml)								
	Ξινόμαυρο		Αγιωργίτικο		Ασύρτικο		Μαλαγουζιά	
	mean	sem	mean	sem	mean	sem	mean	sem
Δείγμα 1	0,783	0,023	2,555	0,542	10,761	0,350	13,479	0,274
Δείγμα 2	1,435	0,028	1,326	0,432	9,843	0,371	13,956	0,042
Δείγμα 3	1,614	0,071	1,506	0,037	11,065	0,375	19,131	1,354
Δείγμα 4	2,115	0,067	1,859	0,036	5,397	0,216	11,409	0,272
Δείγμα 5	1,548	0,104	1,921	0,065	5,465	0,393	15,332	1,323
Δείγμα 6	1,305	0,046	2,303	0,045	9,751	0,864	14,833	0,092
Δείγμα 7	1,566	0,023	2,708	0,010	7,222	0,352	19,611	0,246
Δείγμα 8	1,885	0,011	2,662	0,009	8,910	0,053	22,134	0,278

Από τη σύγκριση των 4 ποικιλιών οίνων, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά φάνηκε ότι οι 2 ερυθροί έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τους 2 λευκούς, ενώ και το Ασύρτικο είναι στατιστικά πιο ισχυρό από την Μαλαγουζιά όπως παρουσιάζεται στην διπλανή εικόνα.



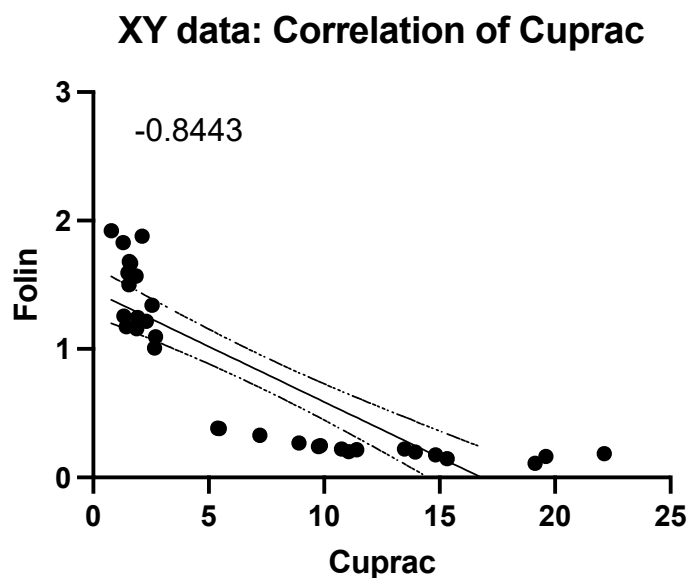
Εικόνα 68: Συγκριτική ανάλυση των 4 ποικιλιών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM, **** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Επιπλέον όσον αφορά τη σύγκριση των ερυθρών με τους λευκούς οίνους, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ειδών οίνου με $p < 0,0001$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 69: Συγκριτική ανάλυση των ερυθρών και λευκών οίνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM. ** στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,0001$).

Τέλος, μετά την ανάλυση της συσχέτισης των τιμών του CUPRAC assay με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($-0,8443$ $p < 0,0001$), που σημαίνει ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες τόσο μειώνεται το AU0.5 υποδηλώνοντας ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.



Εικόνα 70: Ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου και του AU0.5 (-0,8443 $p<0,0001$).

3.3 Συζήτηση

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν το 1^ο μέρος των αναλύσεων των οίνων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Στο 1^ο μέρος έγινε ενδελεχής ανάλυση 8 οίνων από κάθε μία από τις 4 εξεταζόμενες ποικιλίες Ξινόμαυρου, Αγιωργίτικου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς. Το σύνολο των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκε στους 32 οίνους, περιελάμβανε ένα μεγάλο εύρος δοκιμών, και συγκεκριμένα τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας, την εύρεση της συνολικής πολυφαινολικής σύστασης και την ικανότητα προστασίας του DNA από θραύσεις. Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμήθηκε μέσω της ικανότητας εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών, εκ των οποίων κάποιες είναι συνθετικές, ενώ κάποιες άλλες δημιουργούνται και υπάρχουν σε ζωντανά βιολογικά συστήματα, όπως τα ανθρώπινα κύτταρα. Οι πολυφαινόλες και η δράση τους στα βιολογικά συστήματα είναι ουσιαστικά και ο λόγος που ο οίνος έχει τις ιδιότητες που του προσδίδονται (Barbalho et al., 2020; Ditano-Vázquez et al., 2019; L. Li & Sun, 2019; Waterhouse, 2002), ενώ υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους (Anastasiadi et al., 2009; Fontana et al., 2016; Hong et al., 2021; Myrtsi et al., 2021; v. González de Peredo et al., 2021), αλλά και τον έλεγχο της δραστηρότητάς τους (Kyriazis et al., 2021; Tekos et al., 2021; A. Veskoukis et al., 2019; A. S. Veskoukis et al., 2021; A. S. Veskoukis, Vassi, et al., 2020).

Ο λόγος που ελέγχονται όλα τα παραπάνω είναι γιατί δεν ενδιαφέρει μόνο η ποσοτική εύρεση των πολυφαινολών που περιέχονται σε κάθε οίνο, αλλά το πόσο βιοδραστικό είναι αυτό το φορτίο πολυφαινολών, δηλαδή πόσο αυτές είναι ικανές και δραστικές να προστατέψουν αρχικά το ίδιο το προϊόν από οξειδώσεις και στη συνέχεια να προάγουν την υγεία του ανθρώπου που θα τις καταναλώσει. Τέτοιου είδους αναλύσεις είναι εξαιρετικά σημαντικές καθώς δίνουν πληροφορίες για την επίδραση που έχει το προϊόν στον άνθρωπο και πώς μπορεί μια σειρά από πρακτικές, να βελτιώσει την ποιότητα αυτού που θα καταναλώσει ο πολίτης. Πιο αναλυτικά, σε μία κατηγορία προϊόντος, όπως ο οίνος, το σύνολο των βιοδραστικών ενώσεων που περιέχει, καθώς και η δραστηρότητα αυτών, είναι αποτέλεσμα μιας σειράς επιλογών και καταστάσεων όπως:

1. Ποικιλία
2. Εδαφολογικά στοιχεία

3. Κλιματολογικά στοιχεία
4. Παθογόνα – ξενιστές
5. Καλλιεργητικές πρακτικές
6. Πρακτικές κατά των τρύγο
7. Μεταφορά των καρπών για οиноποίηση
8. Οиноποίηση
9. Παλαίωση
10. Εμφιάλωση
11. Αποθήκευση/διατήρηση πριν την διανομή
12. Διανομή - μεταφορά
13. Αποθήκευση/ διατήρηση στο σημείο πώλησης
14. Αποθήκευση/ διατήρηση στο σπίτι

λα τα παραπάνω σημεία μπορούν το καθένα ξεχωριστά ή και σε συνδυασμούς ή και όλα μαζί, να προάγουν την παραγωγή και τη διατήρηση ενός εξαιρετικά βιοδραστικού οίνου, να δημιουργήσουν εξ' αρχής ένα πολύ φτωχό σε αντιοξειδωτικά προϊόν, ή τέλος να δημιουργήσουν έναν εξαιρετικά βιοδραστικό οίνο, ο οποίος μέχρι να φτάσει στον καταναλωτή να έχει χάσει όλες ή σχεδόν όλες τις βιοδραστικές του ικανότητες (Karydas et al., 2020; Longhi et al., 2022; Schleiffer & Speiser, 2022; Sequino et al., 2022; Tarko et al., 2020; R. Wang & van Wely, 2020). Ελέγχοντας τα 14 αυτά σημεία ή κατευθείαν το τελικό προϊόν με το σύνολο των μεθόδων που περιγράφονται στο κεφάλαιο αυτό, μπορεί να γίνει αξιολόγηση της ποιότητας των προϊόντων ώστε ο καταναλωτής να γνωρίζει, ποια μάρκα και ποιο προϊόν είναι καλύτερο μεταξύ των υπολοίπων ομοίων του. Ένα τελικό προϊόν στο ράφι ενός καταστήματος λιανικής πώλησης που διατηρεί σε υψηλά επίπεδα την βιοδραστικότητα του σημαίνει ότι έχει υποστεί τη λιγότερο δυνατή καταπόνηση στα 14 προαναφερθέντα σημεία, και έχει την ικανότητα να προσφέρει το καλύτερο στην υγεία και ευεξία του καταναλωτή. Στην κατεύθυνση αυτή έχουν δημιουργηθεί αρκετά σήματα ποιότητας στην ΕΕ, με σκοπό να βοηθήσουν τον πολίτη να επιλέξει το καλύτερο δυνατό για την υγεία του. Κάποια σήματα ενημερώνουν για την τοπικότητα, όπως τα ΠΟΠ και ΠΓΕ(ΠΓΕ | Προστασία Γεωγραφικής Ένδειξης - Your Europe), άλλα ενημερώνουν για την αναλογία του διαθρεπτικού πίνακα, όπως το Nutriscore (EUIPO - ESearch), άλλα για την αποκλειστικά φυτική προέλευση του προϊόντος, όπως το «Vegan», και άλλα

ενημερώνουν για τη βιολογική διατήρηση του προϊόντος, όπως το «Bio» (*The Organic Logo*, n.d.). Για τον έλεγχο της βιοδραστικότητας του προϊόντος, και τη σύγκριση της ποιότητας μεταξύ όμοιων προϊόντων δημιουργήθηκε το σήμα AFQ (EUIPO - ESearch). Καθένα από τα παραπάνω έχει την δική του αξία, και όλα μαζί με το επιστημονικό πεδίο που αντιπροσωπεύουν, προσπαθούν να δώσουν την πληροφορία στον τελικό καταναλωτή να επιλέξει την κατάλληλη τροφή για τον ίδιο. Η κατάλληλη τροφή για τον κάθε άνθρωπο είναι ένας αλγόριθμος της κουλτούρας του έθνους όπου ζει, της ποιότητας της τροφής, των θρεπτικών αναγκών του και βασικότερο από όλα, της στάσης και του τρόπου ζωής του, με το απόφθεγμα ενός εκ των 7 σοφών της αρχαιότητας, Κλεόβουλου (6ος αιώνας π.Χ.), «μέτρον ἄριστον», να δίνει τη σωστή κατεύθυνση.

Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 4 ελληνικές ποικιλίες (Βηλάνα, Βιδιανό Κοτσιφάλι και Μανδηλαριά) έδειξε ότι η αντιοξειδωτική δράση των καρπών ήταν μεγαλύτερη λίγες εβδομάδες πριν την ημερομηνία που οι οινοποιοί αποφάσισαν να ξεκινήσουν τον τρύγο, πρακτική που μειώνει κατά πολύ την τελική ποιότητα και προστιθέμενη αξία του προϊόντος. Εάν γίνουν και άλλες παρόμοιες μελέτες, θα μπορούσαν να βοηθήσουν τους παραγωγούς να επιλέξουν την κατάλληλη ημερομηνία για τη συγκομιδή και τη δημιουργία εξαιρετικής ποιότητας και βιοδραστικότητας οίνων (Kontaxakis et al., 2022).

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των οίνων έδειξαν ότι οι ερυθροί είναι πιο πλούσιοι σε βιοδραστικές ενώσεις και παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε όλες τις δοκιμές που αξιολογήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με πλήθος μελετών της βιβλιογραφίας και σχετίζονται τόσο με την μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινόλων που περιέχουν, όσο και με την μεγαλύτερη ποικιλία αυτών (Kilmartin et al., 2001; Messeri, 1995; Opie & Lecour, 2007; Porteri et al., 2010; Taborsky et al., 2012, 2017; Ziyatdinova et al., 2016). Το φαινόμενο αυτό προκύπτει τόσο από τις ποικιλίες, όσο και από τη διαδικασία οινοποίησης, στην οποία οι ερυθροί οίνοι σχηματίζονται από περισσότερα σημεία της ράγας και όχι μόνο από χυμό που δημιουργεί τους λευκούς. Μια μελέτη σε ελληνικούς ερυθρούς και λευκούς οίνους έδειξε ότι η ερυθρή ποικιλία Μανδηλαριά, εμφάνισε περισσότερες πολυφαινόλες τόσο σε συνολική ποσότητα αλλά και περισσότερα είδη, σε σχέση με την λευκή ποικιλία Μονεμβασιά, που αν και παρουσίασε λιγότερες πολυφαινόλες από

την ερυθρή, ήταν και πάλι αρκετά πλούσια σε σχέση με άλλες λευκές ποικιλίες (Myrtsi et al., 2021).

σον αφορά τις διαφορές των οίνων της ίδιας ποικιλίας, αξίζει να αναφερθεί πως και τα 8 δείγματα, έχουν σχετικά όμοιες, ιδιαίτερα υψηλές δραστικότητες. Τα δείγματα των 32 οίνων προέρχονται από διάφορες περιοχές της χώρας σε μια προσπάθεια να καλυφθεί ένα μεγάλο μέρος της επικράτειας ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό. Δείγματα υπήρχαν από περιοχές της Μακεδονίας, της Θεσσαλίας, της Στερεάς Ελλάδας, της Αττικής, της Πελοποννήσου και του Αιγαίου. Η πολυφαινολική σύσταση των Ελληνικών ποικιλιών είναι σχετικά ελλιπής, ωστόσο αυτό που χαρακτηρίζει την βιβλιογραφία είναι η μεγάλη έλλειψη δεδομένων για την αντιοξειδωτική δράση των Ελληνικών ποικιλιών και κυρίως της επίδρασης που έχει ο τρόπος οινοποίησης και παλαίωσης, καθώς είναι γνωστό από μελέτες του εξωτερικού ότι επηρεάζει πολύ το τελικό προϊόν (Arnous et al., 2001; Kontaxakis et al., 2022).

Η μεγάλη πληθώρα αντιδράσεων που αφορούν τις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της οινοποίησης και της ωρίμανσης (αντιδράσεις χημικών και ενζυμικών οξειδώσεων, συμπύκνωση, υδρόλυση κ.λπ.), έχει ως αποτέλεσμα στους οίνους την εμφάνιση ενός πολύπλοκου προφίλ ποικίλων φαινολικών ενώσεων (Myrtsi et al., 2021; Sakkiadi et al., 2007).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες οίνων από άλλες χώρες οπότε και θα πρέπει να εκπονηθούν και άλλες μελέτες σαν την παρούσα, ώστε να επιβεβαιωθούν και να επεκταθούν τα παρόντα αποτελέσματα (Alonso et al., 2002; Brenna & Pagliarini, 2001; Larrauri et al., 1999; López-Vélez et al., 2003). Μια μελέτη σε ελληνικούς οίνους που εξέτασε την αντιοξειδωτική δράση μέσω των δοκιμών DPPH· και FRAP παρουσίασε πολύ ενδιαφέροντα ευρήματα. Τα αποτελέσματα για τη δοκιμή DPPH· έδειξαν ότι τα τμήματα του μίσχου, του καρπού και της ράγας της λευκής ποικιλίας Μονεμβασιά ήταν τα πιο ισχυρά μεταξύ των 2 ερυθρών δειγμάτων Μανδηλαριά και Αηδάνι Μαύρο που εξετάστηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί απόλυτα με όλα τα ευρήματα, τα οποία έδειξαν ότι τα στελέχη της λευκής ποικιλίας εμφάνισαν την πλουσιότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και τις υψηλότερες τιμές TPC. σον αφορά τα δείγματα οίνου ωστόσο, εκείνα που προέρχονταν από ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών (κόκκινοι και ροζέ οίνοι) παρουσίασαν σημαντικά πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες σε σχέση με την λευκή ποικιλία (Myrtsi et al., 2021). Αυτό το αποτέλεσμα στις ελληνικές ποικιλίες, επιβεβαιώνει την

βιβλιογραφία και τονίζει την σημαντική διαδικασία της οινοποίησης στην παραγωγή πλούσιων σε βιοδραστικότητα οίνων. Παρά το γεγονός ότι τα στελέχη της λευκής ποικιλίας ήταν πιο ισχυρά σε σχέση με τα αντίστοιχα των ερυθρών, δεν χρησιμοποιήθηκαν κατά την οινοποίηση, και επομένως δεν προσέφεραν στην τελική δυναμικότητα του προϊόντος. Τέτοιου είδους παραπροϊόντα, ιδιαίτερα πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις (Goutzourelas et al., 2014; Goutzourelas, Stagos, Housmekeridou, et al., 2015; Goutzourelas, Stagos, Spanidis, et al., 2015; Myrtsi et al., 2021; A. S. Veskoukis, Vassi, et al., 2020), πρέπει να αξιοποιούνται από τις εταιρείες με σκοπό τον εμπλουτισμό ζωοτροφών ή τη δημιουργία πολυφαινολικών εκχυλισμάτων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από την βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών. Με τον εμπλουτισμό των ζωοτροφών με τέτοια παραπροϊόντα, μπορούν να συντηρηθούν καλύτερα οι ίδιες οι τροφές, και επομένως να μειωθούν τα χημικά αντιοξειδωτικά, ενώ και τα ίδια τα ζώα έχουν καλύτερη άμυνα και ανάπτυξη, βοηθώντας έτσι τον παραγωγό να παράξει καλύτερης ποιότητας προϊόντα με μειωμένα αντιβιοτικά και άλλα χημικά πρόσθετα, κάτι που αποτελεί και κομβικό άξονα της πρωτοβουλίας της Ευρωπαϊκής ένωσης «from farm to fork» ή «από τη φάρμα στο πιρούνι» (Farm to Fork Strategy).

σον αφορά τη βιομηχανία τροφίμων τα εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφών ενώ στην βιομηχανία καλλυντικών για την δημιουργία προϊόντων 100% φυσικών, από προϊόντα κυκλικής οικονομίας συμβάλλοντας έτσι στην πράσινη οικονομία και να ενταχθούν στο Ecolabel της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα καλλυντικά και τα προϊόντα φροντίδας ζώων, προσφέροντας στους καταναλωτές ολόκληρης της ΕΕ, το πλεονέκτημα της αξιόπιστης απόδειξης της γνησιότητας της πράσινης εταιρείας ή προϊόντος (Clean and Circular Economy: Commission Extends EU Ecolabel to All Cosmetics and Pet-Care). Το συγκεκριμένο ζήτημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς 3 στα 4 καλλυντικά προϊόντα διαφημίζουν ένα περιβαλλοντικά θετικό πρόσημο χωρίς ωστόσο να είναι ελεγμένο και πιστοποιημένο. Με τη χρήση πλούσιων υποπροϊόντων όπως τα παραπάνω, η διαφήμιση αποκτά ουσία και γίνεται πράξη, για την εταιρεία, το περιβάλλον και την κοινωνία (Clean and Circular Economy: Commission Extends EU Ecolabel to All Cosmetics and Pet-Care).

Με σκοπό την παραγωγή 4 εκχυλισμάτων, ένα από την κάθε ποικιλία Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά παρουσιάζεται ο παρακάτω

πίνακας, με την τελική επιλογή του δείγματος που θα εξεταστεί σε ένα 2^ο επίπεδο αναλύσεων. Από τον πίνακα προκύπτει ότι δεν υπάρχει κάποιο δείγμα από κάποια ποικιλία που να είναι πιο δραστικό σε όλες τις μεθόδους εκτός από την ποικιλία Ξινόμαυρο, ενώ στην ποικιλία Μαλαγουζιά, το δείγμα 1 με το δείγμα 2 παρουσίασαν το καθένα σε 3 μεθόδους υψηλότερα σκορ, αλλά, για την επόμενη σειρά αναλύσεων στο 2^ο επίπεδο επιλέχθηκε το δείγμα 1, που περιείχε περισσότερες πολυφαινόλες και καλύτερη δραστικότητα στην ελεύθερη ρίζα που συναντάται στα βιολογικά συστήματα.

Πίνακας 16: Επιλογή δείγματος κάθε ποικιλίας που περνάει στο 2^ο επίπεδο αναλύσεων.

Πιο βιοδραστικός οίνος ανά μέθοδο				
	Ξινόμαυρο	Αγιωργίτικο	Ασύρτικο	Μαλαγουζιά
Folin Ciocalteu	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 1
DPPH	Δείγμα 1	Δείγμα 7	Δείγμα 4	Δείγμα 2
ABTS	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 2
R.P.	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 2
O ₂ ·	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 1
ROO·	Δείγμα 1	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 1
CUPRAC	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 4	Δείγμα 4
Τελική επιλογή	Δείγμα 1	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 1

4 2ο Επίπεδο αναλύσεων. Έλεγχος εκχυλισμάτων οίνων με συνδυασμό *in vitro* τεχνικών.

4.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός του 2^{ου} επιπέδου αναλύσεων είχε ως στόχο να δημιουργηθούν τα εκχυλίσματα των 4 οίνων που επιλέχθηκαν ως οι πιο βιοδραστικοί από τις τεχνικές του 1^{ου} επιπέδου και να αναλυθούν εκ νέου με έναν συνδυασμό *in vitro* τεχνικών.

Τα εκχυλίσματα αυτά αξιολογήθηκαν με μία σειρά από *in vitro* δοκιμές που περιλάμβαναν τον έλεγχο της ικανότητας εξουδετέρωσης τόσο συνθετικών όσο και φυσικών ελευθέρων ριζών. Οι συνθετικές ρίζες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι DPPH, ABTS, ενώ δοκιμάστηκε και η ικανότητα των εκχυλισμάτων να εξουδετερώσουν τις φυσικές ρίζες Superoxide radical και Hydroxyl Radical.

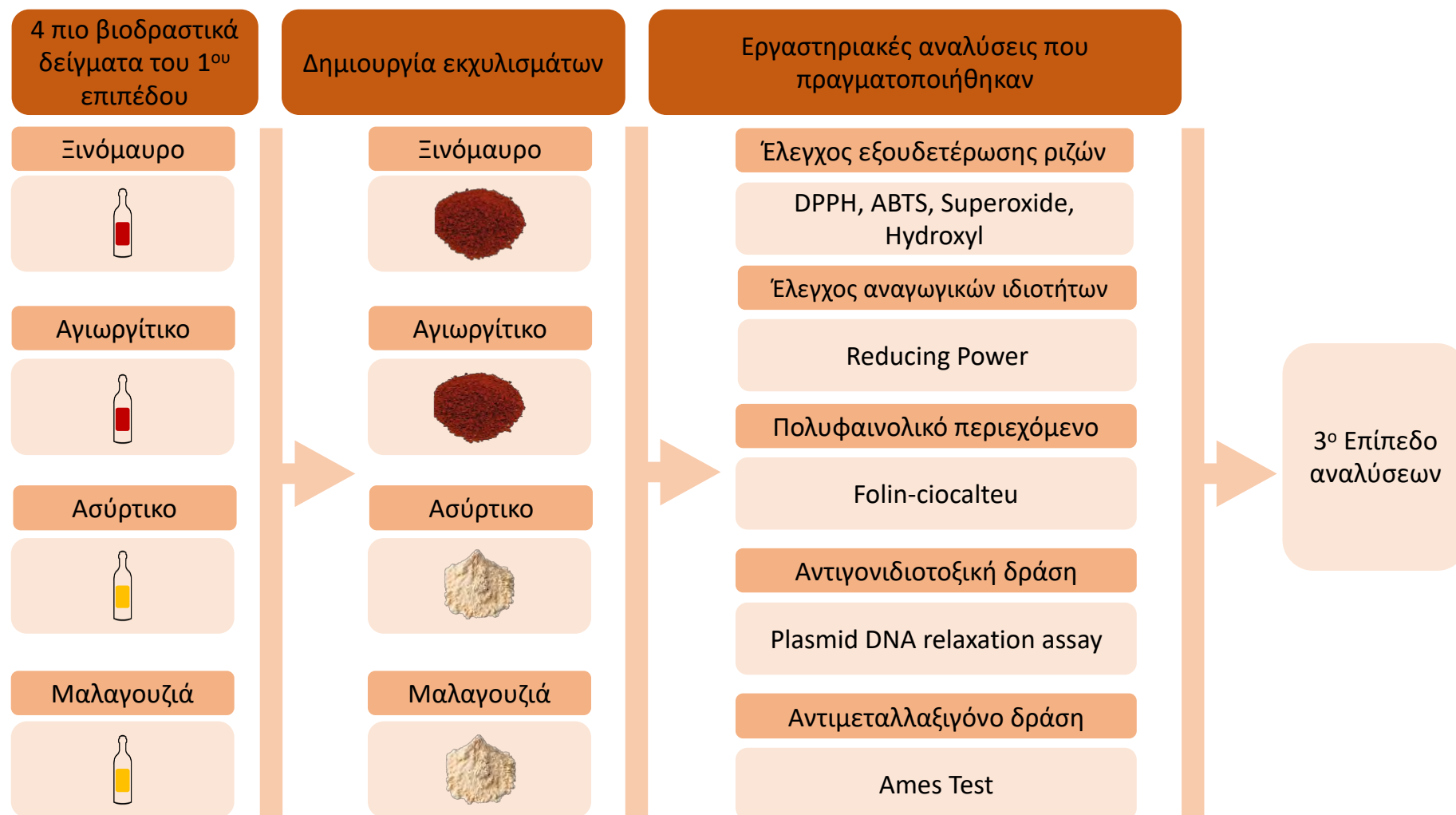
Επίσης, ελέγχθηκαν οι αναγωγικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητας αναγωγής των ιόντων σιδήρου με τη μέθοδο Reducing Power.

Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός του πολυφαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός της αντιγονιδιοτοξικής δράσης με τη μέθοδο Plasmid DNA relaxation assay.

Τέλος, τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν για πιθανή αντιμεταλλαξιγόνο δράση, μία πολύ σημαντική δοκιμή, εγκεκριμένη από τον OECD, τον Οργανισμό Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης, το test του Ames.

Σημαντικές πληροφορίες προέκυψαν για τις ποικιλίες που μελετήθηκαν, με πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα για τους ερυθρούς αλλά και αναπάντεχα για τους λευκούς οίνους, κυρίως για το Ασύρτικο. Τα 4 δείγματα προχώρησαν στο 3^ο επίπεδο αναλύσεων.

Η γραφική απεικόνιση του 2^{ου} επιπέδου αναλύσεων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 71: Γραφική απεικόνιση 2^{ου} Επιπέδου αναλύσεων.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

Εκτός από τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν και στο 1^ο επίπεδο αναλύσεων και παρουσιάζονται στα κεφάλαια 3.2.1 μέχρι 3.2.5, στο 2^ο επίπεδο αναλύσεων πραγματοποιήθηκαν επιπλέον τα παρακάτω.

4.2.1 Απομόνωση φαινολικού φορτίου

Πρώτο στάδιο της φάσης αυτής αποτέλεσε η αρχική κατεργασία των 4 δειγμάτων, Ξινόμαυρου, Αγιωργίτικου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς για την απομάκρυνση της περιεχόμενης αιθανόλης. Η αιθανόλη που περιέχεται φυσικά στον οίνο, παρεμποδίζει την κατακράτηση των φαινολών από τη ρητίνη και γι' αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η αρχική κατεργασία των δειγμάτων για την απομάκρυνσή της. Για το λόγο αυτό, οι οίνοι συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό, μέχρι μείωση του μισού τους όγκου, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση της αιθανόλης. Μετέπειτα ακολούθησε κατεργασία με ρητίνες προσρόφησης. Η προσρόφηση των φαινολών έγινε με τη χρήση πολυμερικής ρητίνης και η ανάκτηση αυτών με τη χρήση οργανικού διαλύτη. Τέλος, ακολούθησε ξήρανση των δειγμάτων σε Rota vapor και λυοφιλοποίηση τους για την πλήρη απομάκρυνση των διαλυτών και τον προσδιορισμό του ξηρού τους βάρους. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε από την κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

4.2.2 Ανάλυση UHPLC-ESI-TripleTOF-HRMS & σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός

Η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ExionLC™ (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο μάζας Sciex TripleTOF® 5600+, εξοπλισμένο με πηγή ιόντων DuoSpray™ που λειτουργούσε σε αρνητική λειτουργία ESI τόσο για τη βαθμονόμηση όσο και για την απόκτηση δεδομένων. Η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συστήματος παροχής βαθμονομητή (CDS) (AB Sciex). Στο σύστημα εγχύθηκαν 10 μ L κάθε εκχυλίσματος. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε στήλη Fortis Speedcore® (Fortis Technologies Ltd, Cheshire, UK) C18 (10 cm x 2,1 mm, 2,6 μ m) με χρήση διαβάθμισης νερού που περιείχε 0,1% (v/v) μυρμηκικό οξύ (A) και ακετονιτρίλιο (B). Η έκλυση

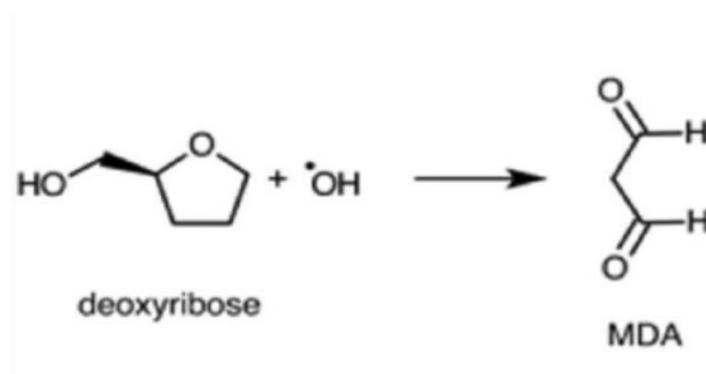
ξεκίνησε στο 5% B, το οποίο διατηρήθηκε για 2 λεπτά και αυξήθηκε στο 100% B σε άλλα 13 λεπτά. Οι συνθήκες αυτές παρέμειναν σταθερές για 2 λεπτά πριν από την επιστροφή στις αρχικές συνθήκες σε 2 λεπτά για επαναδιύλιση 4 λεπτών (συνολικά 22 λεπτά). Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40 °C και ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε σε 0,4 ml/min. Ο φασματογράφος μάζας λειτουργούσε στη λειτουργία απόκτησης εξαρτώμενης από την πληροφορία (IDA), χρησιμοποιώντας σάρωση έρευνας TOF-MS 100-1000 Da και 1 εξαρτώμενη σάρωση TOFMS/MS 40-1000 Da. Το δυναμικό αποσυμπίεσης ρυθμίστηκε σε 80, ενώ η ενέργεια σύγκρουσης (CE) ρυθμίστηκε σε 30 V με διασπορά ± 15 V. Για την πηγή ESI, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 450 °C και η τάση ψεκασμού ιόντων ήταν -4500 V. Το αέριο πηγής και το αέριο εξαγωγής ρυθμίστηκαν στα 50 psi, ενώ το αέριο κουρτίνας ρυθμίστηκε στα 35 psi. Η απόκτηση δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Analyst® 1.7.1 (AB Sciex) και η φασματική ερμηνεία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πλατφόρμας λογισμικού Sciex OS (AB Sciex). Ο σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της γραμμής ροής "suspected screening", εισάγοντας έναν κατάλογο ενώσεων στο λογισμικό και ρυθμίζοντας τον ποσοτικό έλεγχο στην επιλογή "Find 5 peaks" (Εύρεση 5 κορυφών) με σφάλμα μάζας μικρότερο από 10 ppm. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε από την κα. Μαρία Χαλαμπαλάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

4.2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH[•]

Αρχή μεθόδου

Η ρίζα υδροξυλίου είναι μια εξαιρετικά δραστική ρίζα που μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρώντας με τα νουκλεοτίδια του DNA οδηγεί στο σπάσιμο των αλυσίδων και άρα σε μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση και κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα των ουσιών να εξουδετερώνουν την ρίζα υδροξυλίου φανερώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκάστοτε εκχυλίσματος. Οι ρίζες υδροξυλίου (που παράγονται κατά την αντίδραση Fenton) οξειδώνουν τη 2-δεοξυριβόζη και τη διασπούν σε μαλονδιαλδεϋδη (MDA) όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Συνεπώς, η ικανότητα των εκχυλισμάτων

να εξουδετερώνουν την ρίζα υδροξυλίου, μετράται με την αναστολή οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης (Halliwell et al., 1987; A. Veskoukis et al., 2019).



Εικόνα 72. Μετατροπή της 2-δεοξυριβόζης σε MDA μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα $\text{OH}^\bullet$. (Tremel & Šmejkal, 2016)

Πειραματική διαδικασία

Αφού έγιναν οι αραιώσεις των εκχυλισμάτων ακολούθησε η προσθήκη των διαλυμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 17. Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

	Τυφλό δείγμα	Θετικός μάρτυρας	Δείγμα	Αρνητικός μάρτυρας
Phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)	225 μl	225 μl	225 μl	225 μl
2-deoxyribose 10 mM	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl
FeSO_4 -EDTA 10 mM	75 μl	75 μl	75 μl	75 μl
H_2O_2 10 mM	-	75 μl	75 μl	-
dH_2O	375 μl	345 μl	250 μl	325 μl
Εκχύλισμα	-	-	50 μl	50 μl
Επώαση 1 ώρα στους 37°C (κλίβανος)				
TCA 2.8%	375 μl	375 μl	375 μl	375 μl
TBA 1%	375 μl	375 μl	375 μl	375 μl
Ντελ	1500 μl	1500 μl	1500 μl	1500 μl

Αφού προστέθηκε και το δείγμα, έγινε επώαση για 1 h στους 37°C και στη συνέχεια προσθήκη 375 μ l TCA 2.8 % και 375 μ l TBA 1 %. Έπειτα το μείγμα έβρασε για 10 λεπτά και κρύωσε σε πάγο. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520 nm. Τα δείγματα χωρίς H₂O₂ αποτέλεσαν το τυφλό. Τέλος, έγινε έλεγχος αν η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να απορροφήσει στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 520 nm. λες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3 φορές.

Με την παρακάτω εξίσωση χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] :

$$\% \text{ Hydroxyl radical scavenging activity (αναστολή)} = \frac{A_o - A_d}{A_o} \times 100$$

που A_o → η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520 nm και A_d → η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520 nm.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράστηκαν με τη μορφή IC₅₀. Πρόκειται για την απαιτούμενη συγκέντρωση για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας. σο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀, τόσο υψηλότερη η δραστητικότητα.

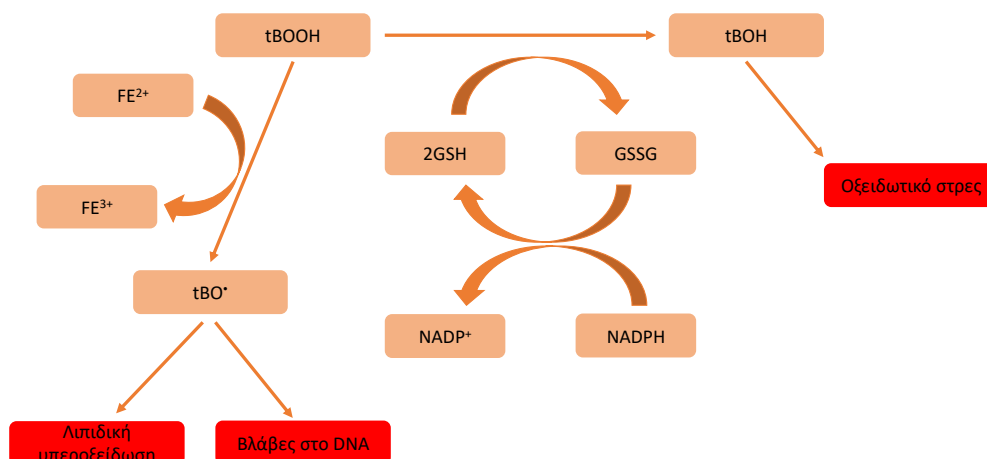
4.2.4 Αποτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων μέσω της δοκιμασίας Ames

Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να γίνει η εύρεση πιθανών μεταλλαξιογόνων ή αντιμεταλλαξιογόνων ουσιών ή/και εκχυλισμάτων ή/και μειγμάτων με τη βοήθεια του βακτηρίου *Salmonella typhimurium* και με την χρήση του στελέχους TA102 (Mortelmans & Zeiger, 2000; Test Guideline No. 471 Bacterial Reverse Mutation Test Section 4 Health Effects OECD/OCDE 471 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Bacterial Reverse Mutation Test, 2020; A. Veskoukis et al., 2019). Η χρήση του συγκεκριμένου στελέχους έγινε γιατί αυτό παρουσιάζει ευαισθησία σε οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον το TA102 διαθέτει μια μετάλλαξη που αδρανοποιεί ένα ένζυμο στο οπερόνιο της ιστιδίνης με αποτέλεσμα το στέλεχος αυτό να είναι αυξότροφο για το συγκεκριμένο αμινοξύ. Η μετάλλαξη αυτή είναι μια μετάλλαξη της hisG428 και προκαλεί τον τερματισμό της μεταγραφής (TAA) ενώ εντοπίζεται στο πλασμίδιο pAQ1 που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα στα βακτήρια

Salmonella typhimurium TA102. Σαν αποτέλεσμα πολλαπλασιάζονται οι πιθανές θέσεις αναστροφών μεταλλάξεων και παράλληλα οι πιθανότητες εμφάνισης επαναμεταλλαγμένων αποικιών. Επιπρόσθετα, το πλασμίδιο αυτό δημιουργεί ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, που χρησιμοποιείται ως δείκτης ανίχνευσης. Επιπλέον, το *Salmonella typhimurium* TA102 φέρει τη μετάλλαξη rfa η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόκληση ελλειμματικού λιποπολυσακχαριτικού στρώματος στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου και επομένως το κάνει εύκολα διαπερατό σε μεγάλου μοριακού βάρους ουσίες. Τέλος το στέλεχος αυτό περιέχει ένα ακόμα πλασμίδιο, το pKM101 το οποίο, έχει την ιδιότητα να πολλαπλασιάζει μεταλλάξεις που προκαλούνται από υπεριώδη ακτινοβολία και χημικές ενώσεις καθώς ευνοεί τον επιδιορθωτικό μηχανισμό βλαβών DNA που είναι επιρρεπές σε λάθη.

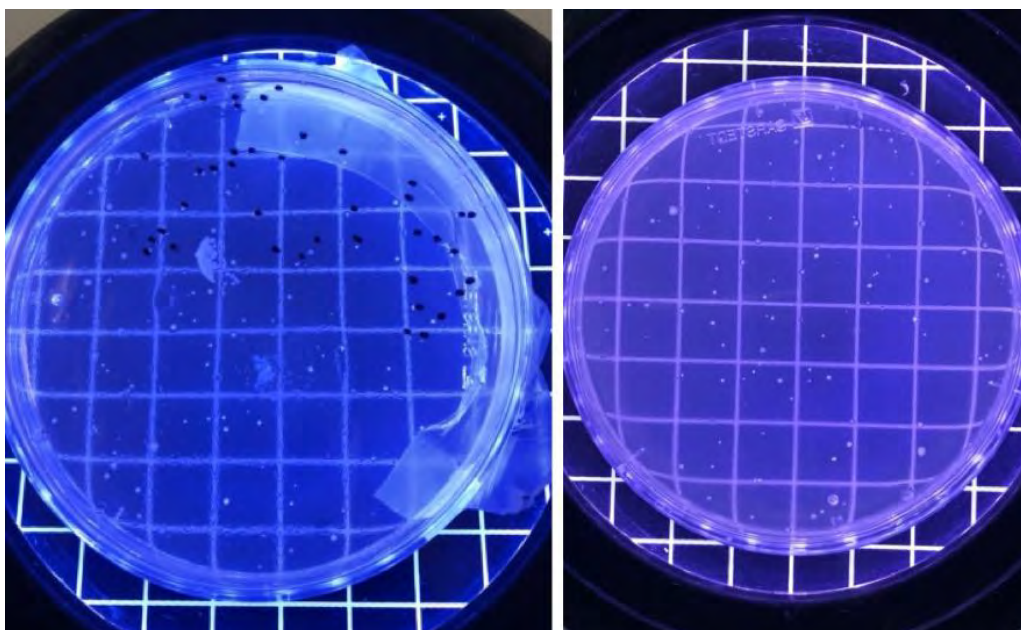
Η καλλιέργεια του *Salmonella typhimurium* TA102 σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό με ίχνη ιστιδίνης επιτρέπει ένα μικρό αριθμό διαιρέσεων (6 με 8) όπου ενδέχεται να γίνουν επαναμεταλλάξεις στο οπερόνιο της ιστιδίνης και να δημιουργηθεί ξανά ο άγριος τύπος που επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτύσσονται και απουσία της ιστιδίνης σε σταθερές αποικίες (~ 200-300/τρυβλίο για το TA102). Με την προσθήκη μιας ουσίας με μεταλλαξιγόνο δράση, προκαλείται δόσοεξαρτώμενη αύξηση του αριθμού των επαναμεταλλάξεων και συνεπώς των αποικιών, ενώ ένας αντιμεταλλαξιγόνος παράγοντας μειώνει τις αποικίες.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο μεταλλαξιγόνος παράγοντας t-BOOH, σε ποσότητα τέτοια ώστε οι παρατηρούμενες αποικίες να διπλασιάζονται, ενώ ταυτόχρονα χορηγήθηκαν τα 4 εκχυλίσματα οίνων σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανή αντιμεταλλαξιγόνος δράση τους. Το οργανικό υδροϋπεροξειδίο t-BOOH αποτελεί έναν οξειδωτικό παράγοντα που μειώνει τα ενδογενή επίπεδα GSH, καθότι οξειδώνεται μέσω της ενζυμικής δραστηριότητας της GPx, ενώ ταυτόχρονα αντιδρά με ιόντα Fe^{2+} δημιουργώντας ρίζες t-BO• με αποτέλεσμα να οξειδώνονται βιομόρια του βακτηρίου όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (Hix et al., 2000).



Εικόνα 73: Μηχανισμός δράσης του tBOOH.

Με σκοπό τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας των 4 εκχυλισμάτων οίνων, θρεπτικό υλικό Nutrient Broth, επιμολύνθηκε με το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA102 και στη συνέχεια επώαστηκαν σε κλίβανο (37°C) μέχρι η οπτική απορρόφηση στα 540 nm να είναι ίση με 0,1-0,2 ($1-2 \times 10^9$ αποικίες/ml), όπου και η καλλιέργεια είναι σε εκθετική φάση αύξησης. Στην συνέχεια, σε falcon που τοποθετήθηκαν μέσα σε υδατόλουτρο και σε θερμοκρασία 45°C (ώστε να μην πήξει το άγαρ), αναμίχθηκαν 100 μl καλλιέργειας, 2 ml διαλύματος Top Agar (NaCl, Agar και ίχνη ιστιδίνης), 50 μl t-BOOH (0,4 mM) και 50 μl εκχυλίσματος σε εύρος συγκεντρώσεων και έπειτα επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα Glucose Minimal άγαρ [γλυκόζη και άλατα Vogel-Bonner (MgSO₄, κιτρικό οξύ, K₂HPO₄, Na₂NH₂PO₄)]. Ακολούθησε επώαση σε κλίβανο (37°C) για 48 ώρες και καταμέτρηση των επαναμεταλλαγμένων αποικιών όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

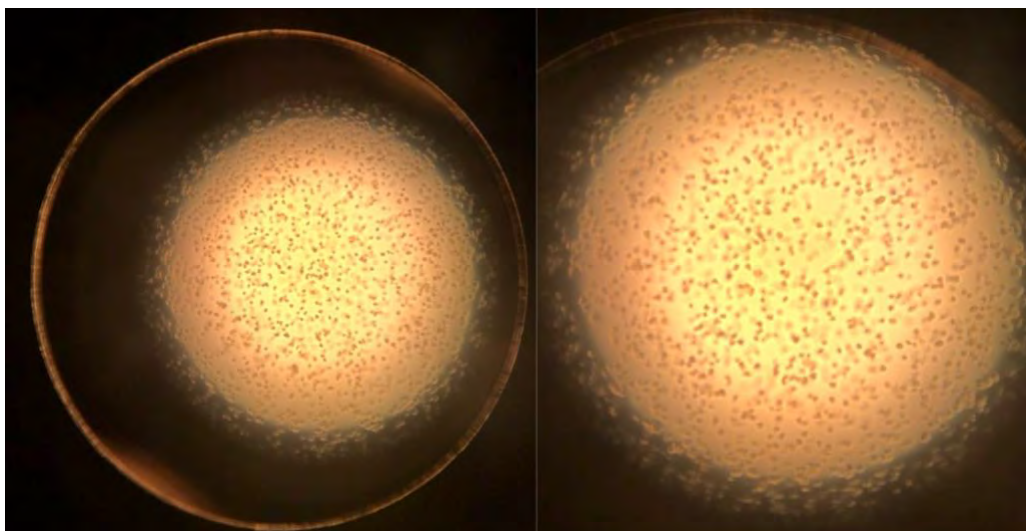


Εικόνα 74: Καταμέτρηση αποικιών.

Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις, ενώ έγιναν 3 ανεξάρτητα πειράματα. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία που απουσίαζε τόσο ο οξειδωτικός παράγοντας όσο και το εκάστοτε εκχυλίσμα οίνου, ενώ σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με την παρουσία του οξειδωτικού και την απουσία εκχυλίσματος οίνου. Τέλος, για τον έλεγχο των 2 μεγαλύτερων συγκεντρώσεων εκχυλίσματος έγινε προσθήκη αυτών σε τρυβλία απουσία οξειδωτικού παράγοντα.

Για τον καθορισμό της συγκέντρωσης του t-BOOH πραγματοποιήθηκε έλεγχος ενός εύρους συγκεντρώσεων (0,2, 0,4, 0,8 και 1,6 mM/τρυβλίο) ως προς τη μεταλλαξιγόνο δράση στα βακτήρια. Τελικά επιλέχθηκε η συγκέντρωση που διπλασίασε τις παρατηρούμενες αποικίες χωρίς να παρουσιάζει τοξικότητα (0,4 mM/τρυβλίο). Επιπλέον έγινε ανάλυση για την εμφάνιση κυτταροτοξικότητας στα βακτήρια από το t-BOOH αλλά και από τα εκχυλίσματα οίνου. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε μέσω οπτικού μικροσκοπίου (40x μεγέθυνση), καθώς εκτός από τις επαναμεταλλαγμένες αποικίες, σε κάθε τρυβλίο υπάρχουν χιλιάδες μικροσκοπικές αποικίες που δεν είναι ορατές χωρίς μικροσκόπιο και παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα. Η εμφάνιση τους στα τρυβλία οφείλεται στα ίχνη ιστιδίνης στο Top Agar που επιτρέπει κάποιες διαιρέσεις ακόμα και στα μη επαναμεταλλαγμένα βακτήρια. Συνεπώς, έγινε σύγκριση μεταξύ της πυκνότητας των μικροαποικιών στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα τα οποία θα έπρεπε να είναι σε ίδιο αριθμό

και πυκνότητα, διαφορετικά ο οξειδωτικός παράγοντας ή το εκχύλισμα είναι σε συγκέντρωση που προκαλεί τοξικότητα στα βακτήρια και το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί.



Εικόνα 75: Μικροσκοπικές αποικίες που δηλώνουν ότι η συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα αλλά και του εκχυλίσματος δεν είναι τοξική για τα βακτήρια.

Για την ποσοτικοποίηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, υπολογίστηκε η τιμή IC₅₀ από το διάγραμμα αναστολής/συγκέντρωσης. Η αναστολή της μεταλλαξιγόνου δράσης του t-BOOH από τα εκχυλίσματα υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των αποικιών σε κάθε τρυβλίο σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_{\theta} - A_{\delta} / A_{\theta} - A_0) \times 100\%$$

A_θ: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τρυβλίο του θετικού μάρτυρα (TA102 και t-BOOH).

A_δ: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τρυβλίο παρουσία του εκχυλίσματος (TA102, εκχύλισμα και t-BOOH).

A₀: Οι επαναμεταλλαγμένες αποικίες His⁺/τρυβλίο στον αρνητικό μάρτυρα (TA102).

4.2.5 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση one-way Anova ακολουθούμενης από τη δοκιμή Dunnett για πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων. Για την ανάλυση έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS (έκδοση 21.0

SPSS Inc., Chicago, IL, ΗΠΑ). Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση (SD) και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Απομόνωση φαινολικού φορτίου

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την διαδικασία απομόνωσης του φαινολικού φορτίου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 18: Βάρη και αποδόσεις δειγμάτων.

Ποικιλία	γκος οίνου προς επεξεργασία (mL)	Βάρος φαινολικού φορτίου (gr)	% Απόδοση φαινολών (ανά 100 gr ξηρού βάρους)	% Απόδοση φαινολών (ανά 100 ml οίνου)
Ξινόμαυρο	750	3,88	19,52	0,51
Αγιωργίτικο	750	3,52	17,91	0,46
Ασύρτικο	750	1,42	8,85	0,18
Μαλαγουζιά	750	1,77	12,97	0,2

4.3.2 Ανάλυση UHPLC-ESI-TripleTOF-HRMS και σύγκριση μεταβολιτών

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι δημιουργίας προφίλ μέσω υγρής χρωματογραφίας με φασματοσκοπία μάζας υψηλής ανάλυσης (LC-HRMS) με σκοπό την ταυτοποίηση των συστατικών του οίνου, κυρίως φαινολικών, με έμφαση στα φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Για λόγους ταυτοποίησης αλλά και για την παρατήρηση των επιπέδων των δευτερογενών μεταβολιτών που είχαν καταγραφεί προηγουμένως σε δείγματα οίνου εφαρμόστηκε η ανάλυση «υπόπτων ενώσεων» (suspect screening analysis). Συνοπτικά, όλα τα δείγματα οίνου μελετήθηκαν ως προς την εμφάνιση 65 ενώσεων, η ύπαρξη των οποίων έχει ήδη αναφερθεί με τη χρήση της πλατφόρμας Sciex OS Analytics (Jaitz et al., 2010; la Torre et al., 2006; Lukić et al., 2019). Η δοκιμαστική ταυτοποίηση βασίστηκε στην τιμή «Formula Finder», στην αντιστοιχία αναλογίας ισοτόπων και στα φάσματα HRMS/MS. Μετά την εξάλειψη των χαρακτηριστικών που ήταν ανιχνεύσιμα σε ίχνη ή δεν υπήρχαν και στις τέσσερις ποικιλίες, δόθηκε προτεραιότητα σε 29 ενώσεις και αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν οι σχετικές τους συγκεντρώσεις οι οποίες παρουσιάζονται στους παρακάτω 2 πίνακες.

Πίνακας 19: Κατάλογος των ενώσεων που περιλαμβάνονται στη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων.

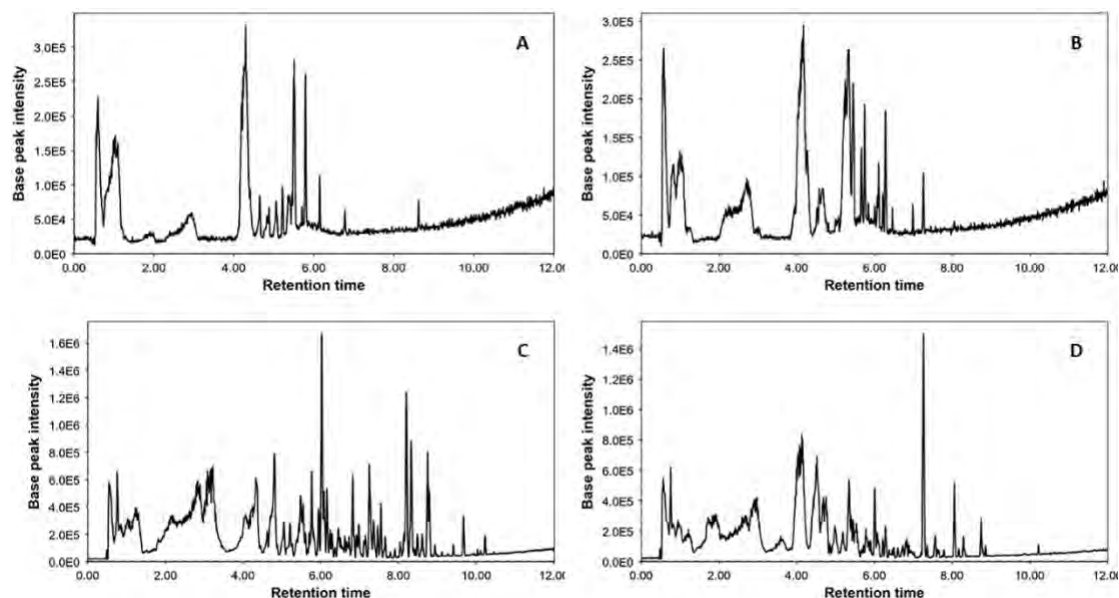
Component Name	Retention Time (min)	Pseudomolecular Ion [M-H] ⁻	Mass Error (ppm)	Molecular Formula
gallic acid	1.02	169.014	1.053	C ₇ H ₅ O ₅
protocatechuic acid	1.93	153.019	0.749	C ₇ H ₅ O ₄
hydroxytyrosol	2.3	153.056	0.968	C ₈ H ₉ O ₃
caftaric acid	2.86	311.041	0.848	C ₁₃ H ₁₁ O ₉
gentisic acid	3.49	153.019	0.526	C ₇ H ₅ O ₄
coutaric acid	4.39	295.046	0.998	C ₁₃ H ₁₁ O ₈
<i>p</i> -coumaric acid	4.39	163.04	-0.144	C ₉ H ₇ O ₃
caffeic acid	4.76	179.035	1.149	C ₉ H ₇ O ₄
fertaric acid	4.82	325.057	2.367	C ₁₄ H ₁₃ O ₉
ferulic acid	4.83	193.051	2.154	C ₁₀ H ₉ O ₄
tyrosol	5.45	137.061	1.194	C ₈ H ₉ O ₂
syringic acid	5.5	197.046	2.384	C ₉ H ₉ O ₅
rutin	5.69	609.146	0.796	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆
ellagic acid	5.71	300.999	1.724	C ₁₄ H ₅ O ₈
quercetin- <i>O</i> -hexoside	5.76	463.088	0.819	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂
quercetin- <i>O</i> -glucuronide	5.79	477.067	0.706	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃
kaempferol- <i>O</i> -hexoside	5.84	447.093	0.270	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁
piceid	6.25	389.124	-0.036	C ₂₀ H ₂₁ O ₈
taxifolin	6.45	303.051	0.203	C ₁₅ H ₁₁ O ₇
apigenin- <i>O</i> -hexoside	6.5	431.098	1.841	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀
astringin	6.59	405.119	0.785	C ₂₀ H ₂₁ O ₉
chlorogenic acid	6.65	353.088	1.944	C ₁₆ H ₁₇ O ₉
luteolin	7.01	285.04	3.032	C ₁₅ H ₉ O ₆
quercetin	7.03	301.035	2.187	C ₁₅ H ₉ O ₇
apigenin	7.56	269.046	0.020	C ₁₅ H ₉ O ₅
kaempferol	7.66	285.04	1.626	C ₁₅ H ₉ O ₆
hesperetin	7.78	301.072	1.188	C ₁₆ H ₁₃ O ₆
laricitrin	7.81	331.046	0.803	C ₁₆ H ₁₁ O ₈
rhamnetin	7.81	315.051	0.242	C ₁₆ H ₁₁ O ₇

Πίνακας 20: Κατάλογος των ενώσεων που περιλαμβάνονται στη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων με αποτύπωση του Peak Area και άλλων παραμέτρων.

Component Name	Retention Time (min)	Precursor Mass	Formula	Peak Area			
				Ασύρτικο	Μαλαγουζιά	Αγιωργίτικο	Ξινόμαυρο
gallic acid	1,02	169,014	C ₇ H ₅ O ₅	6,02E+06	4,11E+06	9,23E+06	3,80E+05
protocatechuic acid	1,93	153,019	C ₇ H ₅ O ₄	4,60E+05	2,52E+05	8,40E+05	4,48E+05
hydroxytyrosol	2,3	153,056	C ₈ H ₉ O ₃	4,39E+05	1,36E+05	4,75E+05	8,86E+04
caftaric acid	2,86	311,041	C ₁₃ H ₁₁ O ₉	5,98E+06	8,99E+06	6,01E+07	3,44E+07
gentic acid	3,49	153,019	C ₇ H ₅ O ₄	7,25E+04	7,81E+04	2,24E+05	3,64E+05
coutaric acid	4,39	295,046	C ₁₃ H ₁₁ O ₈	3,56E+06	5,03E+06	2,57E+07	8,81E+06
p-coumaric acid	4,39	163,04	C ₉ H ₇ O ₃	2,79E+05	3,75E+05	1,81E+06	4,49E+05
caffeic acid	4,76	179,035	C ₉ H ₇ O ₄	3,96E+05	7,86E+05	2,72E+06	5,11E+06
fertaric acid	4,82	325,057	C ₁₄ H ₁₃ O ₉	1,09E+06	7,90E+05	1,46E+07	7,77E+06
ferulic acid	4,83	193,051	C ₁₀ H ₉ O ₄	6,48E+04	3,74E+04	6,67E+05	3,66E+05
tyrosol	5,45	137,061	C ₈ H ₉ O ₂	1,09E+03	2,95E+03	6,35E+04	1,52E+05
syringic acid	5,5	197,046	C ₉ H ₉ O ₅	2,13E+06	1,78E+06	3,89E+06	1,50E+05
rutin	5,69	609,146	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	2,28E+04	2,45E+04	4,43E+05	2,71E+04
ellagic acid	5,71	300,999	C ₁₄ H ₅ O ₈	4,20E+05	8,71E+05	3,71E+05	5,31E+05
quercetin-O-hexoside	5,76	463,088	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	7,34E+04	6,65E+04	1,62E+06	7,22E+04
quercetin-O-glucuronide	5,79	477,067	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃	1,75E+06	1,25E+06	4,74E+06	1,42E+05
kaempferol-O-hexoside	5,84	447,093	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	1,46E+05	5,81E+04	5,85E+05	5,95E+04
piceid	6,25	389,124	C ₂₀ H ₂₁ O ₈	8,71E+04	4,83E+05	1,55E+05	4,70E+04
taxifolin	6,45	303,051	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	1,82E+04	1,36E+04	9,11E+04	4,64E+04
apigenin-O-hexoside	6,5	431,098	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	2,65E+04	4,76E+04	1,19E+06	5,16E+05
astringin	6,59	405,119	C ₂₀ H ₂₁ O ₉	3,95E+04	1,53E+04	3,18E+04	8,75E+03
chlorogenic acid	6,65	353,088	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	3,23E+04	2,33E+04	1,82E+06	7,13E+05
luteolin	7,01	285,04	C ₁₅ H ₉ O ₆	8,61E+04	7,49E+04	2,89E+05	3,56E+05
quercetin	7,03	301,035	C ₁₅ H ₉ O ₇	1,31E+05	3,86E+05	4,28E+05	2,93E+05
apigenin	7,56	269,046	C ₁₅ H ₉ O ₅	4,81E+03	6,35E+03	9,78E+03	1,30E+04
kaempferol	7,66	285,04	C ₁₅ H ₉ O ₆	3,13E+03	6,73E+03	4,50E+05	1,45E+05
hesperetin	7,78	301,072	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	3,50E+03	4,02E+03	2,39E+04	2,05E+04
laricitrin	7,81	331,046	C ₁₆ H ₁₁ O ₈	8,64E+02	2,73E+02	1,19E+05	1,40E+03
rhamnetin	7,81	315,051	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	3,32E+04	7,56E+04	6,29E+04	1,51E+04

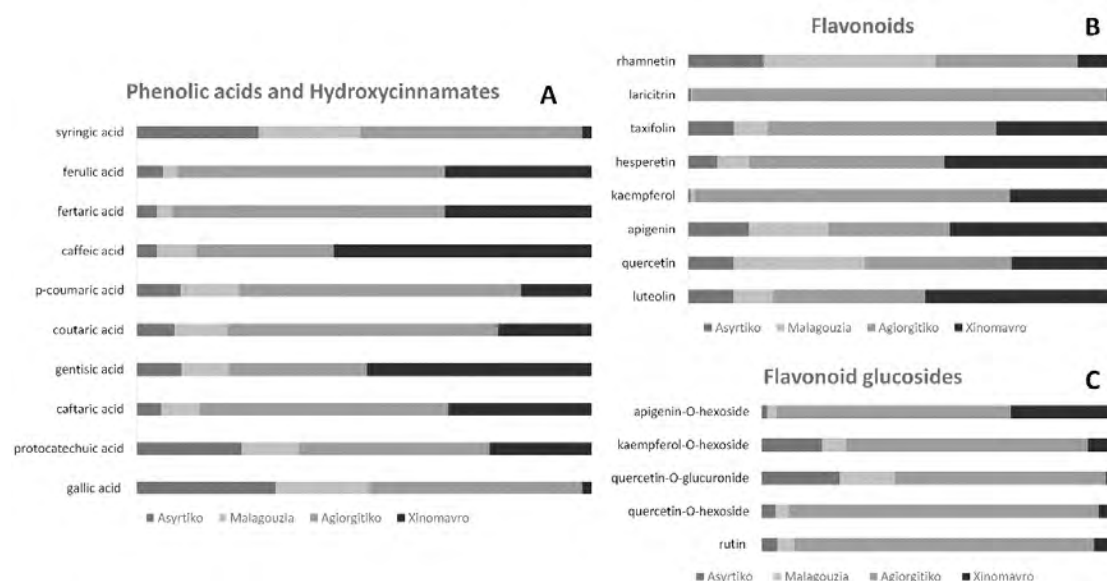
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, όλα τα αναλυθέντα εκχυλίσματα παρουσίασαν ένα πλούσιο φυτοχημικό προφίλ όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα, με τα εκχυλίσματα ερυθρού οίνου να υπερτερούν σε σύγκριση με τα εκείνα λευκού οίνου όσον αφορά τα ανιχνευθέντα χαρακτηριστικά και τη μεταβλητότητα των μεταβολιτών κάτι που υποστηρίζεται και από την βιβλιογραφία (Kammerer et al., 2004; Lambert et al., 2015). Οι περισσότερες ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ανήκαν στις χημικές κατηγορίες των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και των μικρών φαινολών, όπως η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη. Επιπλέον, τα υδροξυκινναμικά

καφταρικό και κουταρικό οξύ ήταν αμφοτέρα άφθονα παρόντα σε όλα τα δείγματα οίνου.



Εικόνα 76: Προφίλ LC-ESI(-)-HRMS ελληνικών δειγμάτων οίνου: (A) Ασύρτικο, (B) Μαλαγουζιά, (C) Αγιωργίτικο και (D) Ξινόμαυρο.

Συνολικά, οι λευκές ποικιλίες οίνου είχαν λιγότερα ανιχνεύσιμα χαρακτηριστικά στο χημικό τους προφίλ, ωστόσο, στους λίγους μικρούς μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν σε ίχνη, όπως το συριγγικό και το ελλαγικό οξύ, τα επίπεδα ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με τα δείγματα των ερυθρών Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο. Η ρεσβερατρόλη ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα στο εκχύλισμα της ποικιλίας Μαλαγουζιά, κάτι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και αναπάντεχο. Η συγκριτική αναπαράσταση μεταξύ των δειγμάτων των διακριτών οικογενειών φαινολικών ενώσεων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 77: Συγκριτική αναπαράσταση (Α) φαινολικών οξέων και υδροξυκινναμικών, (Β) φλαβονοειδών και (Γ) γλυκοζιτών φλαβονοειδών σε όλα τα εκχυλίσματα οίνου.

4.3.3 *In vitro* αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων οίνου

4.3.3.1 Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των ποικιλιών οίνου (TPC)

Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC) προσδιορίστηκε και στα τέσσερα εκχυλίσματα οίνου. Η ανάλυση έδειξε ότι οι ερυθρές ποικιλίες, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο, παρουσίασαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα που προέρχονταν από τους λευκούς οίνους, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 21: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC) των 4 ποικιλιών οίνου.

Όνομα δείγματος		TPC (mg GA/g Extract)
Ερυθροί οίνοι	Ξινόμαυρο	267,1
	Αγιωργίτικο	265,4
Λευκοί οίνοι	Ασύρτικο	155,7
	Μαλαγουζιά	81,1

4.3.3.2 Έλεγχος ικανότητας εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών

λα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη δοκιμασία DPPH, οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων που προέρχονται από το Ξινόμαυρο, το Αγιωργίτικο, το Ασύρτικο και τη Μαλαγουζιά ήταν

13,4, 14,5, 28,4 και 89,4 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το εκχύλισμα από την ποικιλία Ξινόμαυρο εμφάνισε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το Ασύρτικο ($p = 0,012$) και τη Μαλαγουζιά ($p < 0,001$), αλλά όχι με το Αγιωργίτικο ($p = 0,969$). Επιπλέον, το εκχύλισμα από το Αγιωργίτικο ήταν το δεύτερο πιο δραστικό, στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με το Ασύρτικο ($p = 0,016$) και τη Μαλαγουζιά ($p < 0,001$). Τέλος, το εκχύλισμα που προέρχεται από το Ασύρτικο είχε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στη δοκιμασία DPPH μεταξύ των εκχυλισμάτων λευκού οίνου ($p < 0,001$).

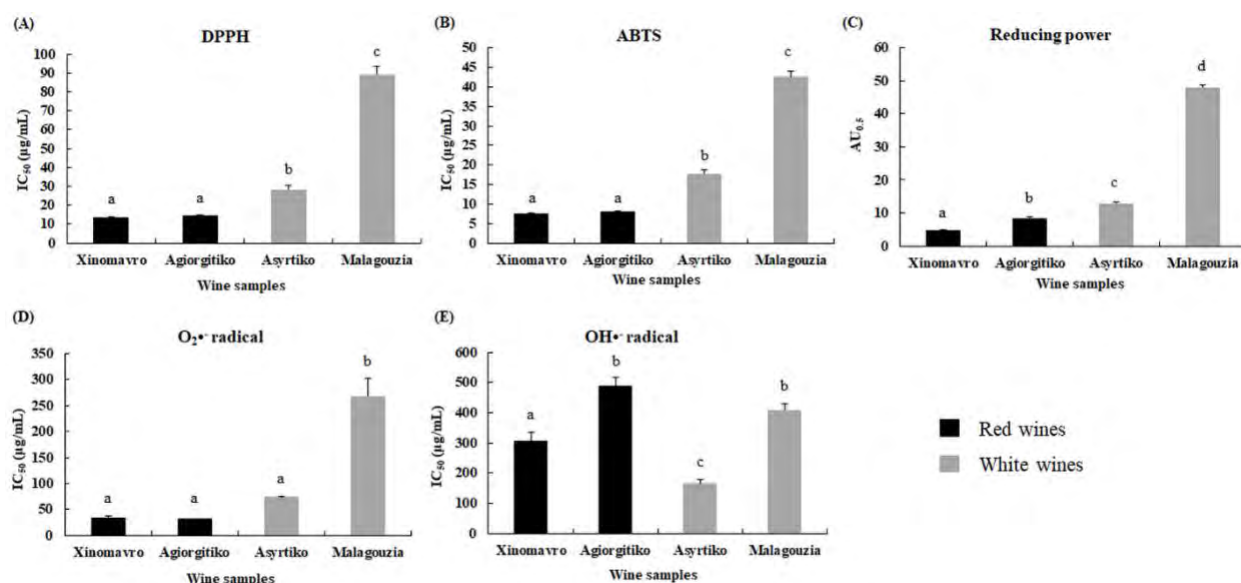
Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και με τη δοκιμασία ABTS. Οι τιμές IC50 προσδιορίστηκαν σε 7,3, 8,2, 18,4 και 43,5 $\mu\text{g/ml}$ για τα εκχυλίσματα που προέρχονται από το Ξινόμαυρο, το Αγιωργίτικο, το Ασύρτικο και τη Μαλαγουζιά, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων Ξινόμαυρου και Αγιωργίτικου ($p = 0,720$), αλλά το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου είχε υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα εκχυλίσματα των Ασύρτικο ($p = 0,001$) και Μαλαγουζιά ($p < 0,001$). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων που προέρχονται τις λευκές ποικιλίες ($p < 0,001$).

πως εκτιμήθηκε με τη δοκιμασία της αναγωγικής ισχύος (Reducing Power), όλα τα εκχυλίσματα οίνου διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους, με τις τιμές AU0,5 των εκχυλισμάτων που προέρχονται από το Ξινόμαυρο, το Αγιωργίτικο, το Ασύρτικο και την Μαλαγουζιά να προσδιορίζονται σε 4,9, 8,3, 13,0 και 48,1 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα (όλες οι τιμές ήταν με $p < 0,01$).

Στη συνέχεια, το εκχύλισμα της Μαλαγουζιάς είχε τη χαμηλότερη επίδοση στην μέθοδο Superoxide radical scavenging μεταξύ των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, οι τιμές IC50 των εκχυλισμάτων Ξινόμαυρου, Αγιωργίτικου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς βρέθηκαν να είναι 34,5, 32,0, 73,9 και 268,5 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε καμία διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων του Ξινόμαυρου, του Αγιωργίτικου και του Ασύρτικου (οι τιμές p κυμάνθηκαν από 0,203 έως 0,999). Αντιθέτως, όλα αυτά τα εκχυλίσματα οίνου παρουσίασαν αυξημένη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το εκχύλισμα της Μαλαγουζιάς ($p = 0,001$).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι παρόλο που τα εκχυλίσματα που προέρχονται από ερυθρό οίνο παρουσίασαν σε όλους τους παραπάνω ελέγχους ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τα εκχυλίσματα που προέρχονται από λευκό οίνο, στην επόμενη μέθοδο (Hydroxyl radical scavenging) βρέθηκε ότι το

εκχύλισμα που προήλθε από το Ασύρτικο είχε τη χαμηλότερη τιμή IC₅₀ (165.7 µg/ml), ενώ οι αντίστοιχες τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων που προήλθαν από το Ξινόμαυρο, το Αγιωργίτικο και τη Μαλαγουζιά ήταν 304,8, 491,2 και 409,1 µg/ml (οι τιμές *p* κυμαίνονταν από 0,001 έως 0,015). Μεταξύ των υπόλοιπων τριών εκχυλισμάτων, το εκχύλισμα που προέρχεται από το Ξινόμαυρο ήταν πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα του Αγιωργίτικου (*p* = 0,006) και της Μαλαγουζιάς (*p* = 0,042), ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του ερυθρού εκχυλίσματος του Αγιωργίτικου και του λευκού εκχυλίσματος της Μαλαγουζιάς (*p* = 0,095). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 78: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκχυλισμάτων ελληνικού οίνου σε *in vitro* δοκιμές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. a-d: οι μέσοι όροι χωρίς κοινό γράμμα απεικονίζουν σημαντική διαφορά (*p* < 0,05).

4.3.3.3 Αντιγενετοξική δράση εκχυλισμάτων οίνου

Η δοκιμή του Plasmid DNA relaxation assay αποκάλυψε ότι το εκχύλισμα που προέρχεται από το Αγιωργίτικο είχε ισχυρότερη αντιγενετοξική δράση σε σύγκριση με το εκχύλισμα που προέρχεται από το Ξινόμαυρο (*p* = 0,006), ενώ δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των εκχυλισμάτων από λευκό οίνο (*p* = 0,076). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ και IC₂₀ των τεσσάρων εκχυλισμάτων οίνου που εξετάστηκαν.

Πίνακας 22: Αντιγονιδιοτοξική δράση των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων οίνου με τη χρήση δοκιμασίας χαλάρωσης πλασμιδίου.

Plasmid DNA Relaxation Assay			
Red Wines		White Wines	
IC50 (μg/mL)		IC20 (μg/mL)	
Ξινόμαυρο	Αγιωργίτικο	Ασύρτικο	Μαλαγουζιά
260.5 ± 27.4 ^a	116.1 ± 19.4 ^b	220.3 ± 14.1	150.1 ± 15.0

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. a,b: οι μέσοι όροι χωρίς κοινό γράμμα απεικονίζουν σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

4.3.3.4 Αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα εκχυλισμάτων οίνου

Πραγματοποιήθηκε το τεστ του Ames για τον προσδιορισμό της πιθανής αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των τεσσάρων εκχυλισμάτων οίνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφή διαφορά στις τιμές IC50 μεταξύ όλων των εκχυλισμάτων που εξετάστηκαν και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Παρά το γεγονός ότι τα εκχυλίσματα που προέρχονται από τα δύο λευκά κρασιά διέφεραν σημαντικά, με τις τιμές IC50 να προσδιορίζονται σε 16,9 και 25,9 μg/mL για τα εκχυλίσματα που προέρχονται από το Ασύρτικο και τη Μαλαγουζιά ($p < 0,001$) αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των δύο εκχυλισμάτων των ερυθρών κρασιών ($p = 0,275$). Αντιθέτως, κάθε εκχύλισμα κόκκινου οίνου ήταν πιο ισχυρό από κάθε εκχύλισμα λευκού οίνου, καθώς οι τιμές IC50 των πρώτων ήταν χαμηλότερες από εκείνες των λευκών κρασιών ($p < 0,001$ σε όλες τις συγκρίσεις).

Πίνακας 23: Αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων οίνου με τη δοκιμή Ames.

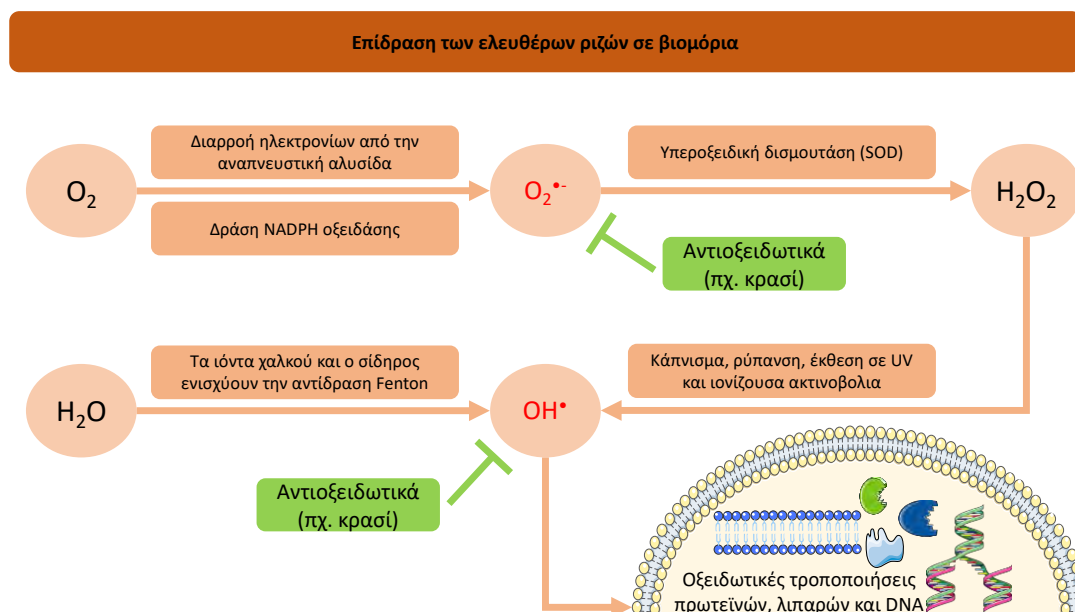
Ames Test		
	Όνομα δείγματος	IC50 (μg/mL)
Ερυθροί οίνοι	Ξινόμαυρο	8.0 ± 0.02 ^a
	Αγιωργίτικο	7.5 ± 0.37 ^a
Λευκοί οίνοι	Ασύρτικο	16.9 ± 0.24 ^b
	Μαλαγουζιά	25.9 ± 0.30 ^c

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος ± SD. a-c: οι μέσοι όροι χωρίς κοινό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$).

4.4 Συζήτηση

Η μελέτη των 4 εκχυλισμάτων έδειξε ότι τόσο οι κόκκινες όσο και οι λευκές ποικιλίες οίνου περιέχουν ενώσεις που παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, δείχνοντας την ικανότητά τους να απομακρύνουν ενδογενείς ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου και το ανιόν σουπεροξειδίου. Ειδικότερα, τα εκχυλίσματα κόκκινου οίνου εμφανίζονται να είναι πιο αποτελεσματικά από τα εκχυλίσματα που προέρχονται από λευκές ποικιλίες, γεγονός που οφείλεται στην υψηλότερη περιεκτικότητα των πρώτων σε πολυφαινόλες, όπως προσδιορίζεται μέσω της ανάλυσης Folin-Ciocalteu.

Το οξειδωτικό στρες έχει ενοχοποιηθεί ως παράγοντας που συμβάλλει στην παθογένεια πολλών κλινικών καταστάσεων (Liguori et al., 2018). Ως εκ τούτου, οι θεραπείες που στοχεύουν στην ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών θα μπορούσαν να προλάβουν αρκετές ασθένειες. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών και του οίνου παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Παρόλο που το γαλλικό παράδοξο έχει επικριθεί (Djoussé et al., 2002; Lucas et al., 2005), λειτούργησε ως η απαρχή για πολλές μελέτες που εξέτασαν τις επιδράσεις της κατανάλωσης οίνου στην ανθρώπινη υγεία, καθώς και τις αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες που διαθέτουν τα συστατικά του (S. He et al., 2008; Soleas et al., 2002a; Tzanova et al., 2020). Παρόλο που τα σταφύλια, τα στέμφυλα και τα εκχυλίσματά τους έχουν διαφορετικό βιοχημικό περιεχόμενο σε σύγκριση με τα οίνοι, έχουν επίσης μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα για τον προσδιορισμό της βιοδραστικότητάς τους όσον αφορά τον προστατευτικό τους ρόλο σε σχέση με τις οξειδωτικές τροποποιήσεις. Σε παλαιότερες μελέτες φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα των σταφυλιών και των στέμφυλων διαθέτουν σημαντικές ποσότητες από δραστικές πολυφαινόλες που είναι ιδιαίτερα ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία και συνεπώς, μπορούν να αξιοποιηθούν ως πρόσθετα για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων με μεγάλη θρεπτική και προστιθέμενη αξία (Apostolou et al., 2013; Chrysoula et al., 2011; Elejalde et al., 2021; Goutzourelas et al., 2014; Goutzourelas, Stagos, Housmekeridou, et al., 2015; Goutzourelas, Stagos, Spanidis, et al., 2015; S. Huang et al., 2012; Quero et al., 2021; Sahpazidou et al., 2014; Stagos et al., 2014; A. S. Veskoukis, Vassi, et al., 2020).



Εικόνα 79: Πιθανός μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών και του οίνου.

Η βιβλιογραφία δεν διαθέτει μια τυποποιημένη σειρά μεθοδολογιών για την αξιολόγηση των βιοδραστικών ιδιοτήτων των τροφίμων μέσω μιας τυποποιημένης σειράς πρωτοκόλλων, ώστε να αποφεύγονται οι διακυμάνσεις από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και προσεγγίσεις (Skaperda, Tekos, Vardakas, et al., 2021), ωστόσο μια μεθοδολογική προσέγγιση (η μεθοδολογία θα πρέπει να τονιστεί και στον σκοπό) παρουσιάζεται παρακάτω και βασίζεται σε πειραματικά μοντέλα του Εργαστηρίου Φυσιολογίας (Kyriazis et al., 2021; A. Veskoukis et al., 2019). Αρχικά, ήταν σημαντικό να αξιολογηθούν οι πιθανές αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιγόνες και προστατευτικές για το DNA δράσεις των εκχυλισμάτων οίνου από τις τέσσερις γηγενείς ελληνικές ποικιλίες με τη χρήση ενός συνδυασμού μοριακών τεχνικών. Αυτά τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν θεμελιώδεις πυλώνες για την αξιολόγηση του ρόλου των εκχυλισμάτων οίνου στην οξειδοαναγωγική βιολογία και, εν συνεχεία, την εμπλοκή τους σε διάφορες ασθένειες. Επιπλέον, η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων οίνου είναι χρήσιμη για τη δημιουργία υψηλής ποιότητας διατροφικών συμπληρωμάτων με χαρακτηρισμένη βιοδραστικότητα ενώ τέλος χρησιμεύει ως μία πρωταρχική μελέτη για την προσέγγιση της εύρεσης του μοριακού μηχανισμού δράσης των εκχυλισμάτων οίνου, κάτι που θα μπορούσε να υποδείξει ισχυρούς στόχους και μόρια για την ανάπτυξη φαρμάκων σε ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Οι ρίζες DPPH και ABTS είναι συνθετικές ελεύθερες ρίζες που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη γρήγορη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης υδρόφιλων και λιπόφιλων ενώσεων (Floegel et al., 2011). Μία άλλη εκτενώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η δοκιμασία της αναγωγικής ισχύος που μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε την ικανότητα μιας φυτοχημικής ένωσης να προσφέρει ηλεκτρόνια που μειώνουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα προϊόντα (Yen & Duh, 1993). Αντίθετα, οι ρίζες υδροξυλίου και σουπεροξειδίου είναι ενδογενώς παραγόμενες ρίζες και συνεπώς, η εκτίμηση όλων αυτών των ριζών δημιουργεί μια ολιστική προσέγγιση για τον προσδιορισμό της προστασίας τόσο από τις συνθετικές ελεύθερες ρίζες όσο και από τις ενδογενείς παραγόμενες ελεύθερες ρίζες (Noda et al., 1997). Επιπλέον, προσδιορίστηκε η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων των 4 οίνων έναντι των θραύσεων του DNA που προκαλούνται από τη ρίζα υπεροξυλίου. Τέλος, αξιολογήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων οίνου κατά της μεταλλαξιογένεσης που προκαλείται από τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH μέσω της δοκιμασίας του Ames.

πως παρουσιάστηκε στα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα κόκκινου οίνου παρουσίασαν διαφοροποιημένη και αυξημένη πολυφαινολική περιεκτικότητα σε σχέση με τα λευκά, κάτι που σχετίζεται με την παρουσία ταννινών και ανθοκυανών στις ποικιλίες ερυθρών οίνων και έρχεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία (Kammerer et al., 2004; Lambert et al., 2015). Οι περισσότερες ενώσεις που ανιχνεύτηκαν ανήκαν στις χημικές κατηγορίες των φλαβονοειδών, των φαινολικών οξέων και των μικρού μοριακού βάρους φαινολών, όπως η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη. Επιπλέον, τα υδροξυκιναμικά καφταρικό και κουταρικό οξύ ήταν άφθονα σε όλα τα δείγματα οίνου. Συνολικά, οι λευκές ποικιλίες οίνου παρουσίασαν λιγότερα ανιχνεύσιμα χαρακτηριστικά στο χημικό τους προφίλ ωστόσο, στους λίγους δευτερεύοντες μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν σε ίχνη, όπως το συριγγικό και το ελλαγικό οξύ, τα επίπεδα ήταν υψηλότερα ακόμα και σε σύγκριση με τα δείγματα των ερυθρών οίνων Αγιωργίτικο ή Ξινόμαυρο. Η ρεσβερατρόλη ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα και μόνο στο εκχύλισμα της ποικιλίας Μαλαγουζιά.

Μέχρι στιγμής, πολύ λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τη χημική σύσταση αυτών των εμβληματικών ελληνικών ποικιλιών οίνου, καθιστώντας δύσκολη την άμεση σύγκριση των παρόντων ευρημάτων με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Επιπλέον, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες δεν περιλάμβαναν δείγματα και από τις τέσσερις

ποικιλίες. Ωστόσο, σε μια ολοκληρωμένη μελέτη που δημοσιεύθηκε από τους Kallithraka et al., οι οίνοι της ποικιλίας Αγιωργίτικο τοποθετούνται επίσης μεταξύ των κορυφαίων δειγμάτων σε συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες (Kallithraka et al., 2001). Επιπλέον, τα ευρήματά έδειξαν ότι το Αγιωργίτικο υπερτερεί έναντι άλλων δειγμάτων σε επίπεδα φαινολικών οξέων και υδροξυκιναμικών, ιδίως σε σχέση με το γαλλικό, το καφταρικό, το κουταρικό, το p-κουμαρικό, το συριγγικό και το φερταρικό οξύ κάτι που έχει επίσης καταγραφεί και σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τη σύνθεση των φαινολών του ελληνικού κόκκινου οίνου (Kallithraka et al., 2006). Στην περίπτωση των φλαβονοειδών, οι περισσότεροι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν ήταν είτε άγλυκα ή γλυκοζυλιωμένες μορφές της κερκετίνης, της απιγενίνης, της λουτεολίνης και της καμφερόλης. Παρόλο που τα ερυθρά δείγματα οίνου παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα φλαβονοειδών, όπως ραμνετίνη και κερκετίνη, η λευκή ποικιλία Μαλαγουζιά είχε επίπεδα αντίστοιχα με εκείνα του Ξινόμαυρου. Επιπλέον, η ποικιλία Μαλαγουζιά ήταν το μόνο εκχύλισμα στο οποίο ανιχνεύθηκε το στιλβένιο ρεσβερατρόλη σε ίχνη και ως εκ τούτου, αποκλείστηκε από τη σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων. Παρ' όλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι σε άλλες μελέτες που έλεγξαν για την παρουσία της ρεσβερατρόλης, αυτή ανιχνεύθηκε, αλλά σε μικρότερες ποσότητες σε σχέση με οίνους από ποικιλίες του εξωτερικού. Μεγάλη σημασία στην εμφάνιση της ρεσβερατρόλης αποτελούν τόσο οι συνθήκες που καλλιεργήθηκε το αμπέλι (υγρασία, ξηρασία, θερμοκρασία, άνεμος, έδαφος) αλλά και η διαδικασία οινοποίησης στη συνέχεια (Anastasiadi et al., 2009; Gerogiannaki-Christopoulou et al., 2006; Goldberg et al., 2007; Goldberg, Karumanchiri, et al., 1995; Goldberg, Ng, et al., 1995; Jeandet et al., 1995; Maumi et al., 2007; Tourtoglou et al., 2014). Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και δεν ανιχνεύθηκε ρεσβερατρόλη, διαφορετικές μορφές ρεσβερατρόλης, όπως ολιγομερή της, εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα.

Μια μελέτη του 2019 δείχνει ότι το p-κουμαρικό οξύ, που ανιχνεύθηκε σε όλα τα εκχυλίσματα, μειώνει τη στεάτωση των ηπατικών κυττάρων και τη συσσώρευση λιπιδίων στον ηπατικό ιστό σε ποντίκια με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Shen et al., 2019). Αυτή ήταν η πρώτη μελέτη που συνέδεσε αυτή τη φαινολική ένωση με την υπερλιπιδαιμία και στη συνέχεια με την αθηροσκλήρωση. Η ποικιλία Αγιωργίτικο βρέθηκε να ασκεί την καλύτερη προστατευτική δράση όσον αφορά τις ρίζες O^{2-} , μεταλλαξιγένεσης (δοκιμασία Ames) και προστασίας του DNA που προκαλείται από $ROO\bullet$. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με το φερταρικό και το

καφταρικό οξύ δείχνουν ότι τα επίπεδά τους είναι αυξημένα στην ποικιλία Αγιωργίτικο, τα οποία πιθανώς είναι και τα κυρίως υπεύθυνα μόρια για την αντιοξειδωτική δράση αυτής της ποικιλίας (Cassino et al., 2016). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν επίσης με άλλες μελέτες σε οίνους και εκχυλίσματα στέμφυλων (Apostolou et al., 2013; Mitrevska et al., 2020; Roussis et al., n.d.; Stratil et al., n.d.). Η άλλη ερυθρή ποικιλία, το Ξινόμαυρο, παρουσίασε σχεδόν παρόμοιες τιμές IC₅₀ στην ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών ABTS και DPPH σε σύγκριση με το Αγιωργίτικο, καθώς επίσης και στη μέθοδο του Reducing Power.

Παραδόξως, το εκχύλισμα της λευκής ποικιλίας Ασύρτικο άσκησε την ισχυρότερη προστατευτική δράση ενάντια στη ρίζα OH[•] μεταξύ όλων των εκχυλισμάτων που δοκιμάστηκαν, τόσο λευκών όσο και των ερυθρών. Τα προηγούμενα δεδομένα υποδεικνύουν την ετερογένεια στην παρουσία βιοδραστικών ενώσεων μεταξύ των ερυθρών και λευκών ποικιλιών οίνου, που επηρεάζουν άμεσα τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες. Επιπροσθέτως, σε μια προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες μέθοδοι αξιολόγησης με τις παραπάνω αλλά για ένα διαφορετικό προϊόν, το ασκορβικό οξύ, μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα από τα εκχυλίσματα οίνου και ασκορβικού οξέος (Skaperda, Tekos, Makri, et al., 2021). Η σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μελετών δείχνει ότι η βιταμίνη C παρουσιάζει μεγαλύτερη προστασία ενάντια στις ρίζες DPPH[•] (Vit C IC₅₀= 4 ± 0,1μg/mL), ABTS^{•+} (Vit C IC₅₀= 3 ± 0,4μg/mL) και στη ρίζα υδροξυλίου (Vit C IC₅₀= 21 ± 0,1μg/mL) σε σύγκριση με τα 4 εκχυλίσματα οίνων που αξιολογήθηκαν στον αφορά την ικανότητα αναγωγικής ισχύος, μόνο το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου ήταν εξίσου ισχυρό σε σχέση με τη βιταμίνη C (IC₅₀= 5 ± 0,6 μg/mL), ενώ όλα τα υπόλοιπα εκχυλίσματα είχαν μικρότερη ικανότητα προστασίας έναντι της βιταμίνης C. Ομοίως, η βιταμίνη C (IC₅₀= 300 ± 30,6 μg/mL) παρουσίασε υψηλότερη αντιγονιδιοτοξική δράση σε σχέση με όλα τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν. Αντίθετα, η αντιμεταλλαξιγόνος ικανότητα της βιταμίνης C ήταν χαμηλότερη (IC₅₀=164 ± 3,1 μg/mL) σε σχέση με όλες τις ποικιλίες οίνου που αξιολογήθηκαν.

Επιπλέον, η συνεργιστική δράση των φαινολικών ενώσεων κάθε ποικιλίας καθιστά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα άμεσα συνδεδεμένη με τη συγκέντρωση

κάθε ένωσης (Hashemzaei et al., 2020). Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης τους παραμένει άγνωστος. Συνεπώς, η περαιτέρω έρευνα σε κυτταρικές σειρές αλλά και *in vivo* συστήματα με ανάλυση μοριακών μηχανισμών είναι πολύ σημαντική με σκοπό να διερευνηθεί η δράση των ελληνικών ποικιλιών οίνου. Επιπλέον, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό της βιοδραστικότητας κάθε ένωσης ξεχωριστά αλλά και συνεργιστικά ώστε να δημιουργηθεί μία βιβλιοθήκη με τις συγκεκριμένες δράσεις κάθε ένωσης αλλά και μείγματος ενώσεων κάτι που φυσικά είναι ιδιαίτερα κοστοβόρο και χρονοβόρο για να πραγματοποιηθεί.

Η παρούσα μελέτη προσέφερε πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητα των τεσσάρων ποικιλιών Ξινόμαυρου, Αγιωργήτικου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς σε πολυφαινόλες καθώς και τη βιοδραστικότητά τους. Το εκχύλισμα που προήλθε από την ποικιλία Αγιωργίτικο είχε τις περισσότερες πολυφαινόλες, με μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά οξέα (π.χ. συριγγικό και φερουλικό οξύ), υδροξυκιναμικό (π.χ. p-κουμαρικό και καφταρικό οξύ), φλαβονοειδή (π.χ. λαρικιτρίνη και kaempferol), και γλυκοζίτες φλαβονοειδών (π.χ. apigenin-O hexoside, quercetin-O-gluconide).

Ωστόσο το εκχύλισμα που είχε σημαντικά ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση ήταν το Ξινόμαυρο, το οποίο εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά υπεροχής, σε όλες τις μεθόδους από την Μαλαγουζιά, σε όλες εκτός από 1 με το Ασύρτικο και σε 2 με το Αγιωργίτικο. Αντίθετα, το εκχύλισμα της ποικιλίας Μαλαγουζιάς περιείχε τα χαμηλότερα επίπεδα πολυφαινολών σε ποσότητα και αριθμό και τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις ενισχύουν την ιδέα ότι η ποικιλία και η ποσότητα των πολυφαινολών καθώς και οι συνέργειες μεταξύ τους μπορούν να ενισχύσουν την αντιοξειδωτική δράση των φυσικών προϊόντων. Επιπλέον, αν και η μέτρια κατανάλωση οίνου έχει συσχετιστεί με την χημειοπροφύλαξη σε διάφορες ασθένειες, η παγκόσμια ερευνητική κοινότητα δεν έχει καταλήξει σε μια σταθερή και συγκεκριμένη σειρά βιοδοκιμών για την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των οίνων. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στα 2 αυτά πρώτα επίπεδα αναλύσεων και περιλαμβάνουν ένα πλήθος ελέγχων για την ικανότητα εξουδετέρωσης τόσο συνθετικών όσο και βιολογικά ενεργών ριζών, λιπόφιλων και υδρόφιλων, καθώς και προστασίας του DNA αλλά και αντιμεταλαξιγόνου δράσης, μπορούν να δώσουν μια καλή επιστημονική εικόνα και να χαρακτηρίσουν έναν οίνο ή ένα εκχύλισμα αυτού. Τέλος, οι παραπάνω μέθοδοι μπορούν να πραγματοποιηθούν και

σε άλλα δείγματα μελλοντικά ή και από άλλα εργαστήρια, προσφέροντας έτσι επαναληψιμότητα, αξιολόγηση, σύγκριση και επιστημονική ακεραιότητα.

Με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα οίνου φάνηκε να παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και αντιμεταλλαξιγόνες και αντιγονιδιοτοξικές δράσεις. Αν και περαιτέρω μελέτες σε κύτταρα και *in vivo* συστήματα είναι απαραίτητες, τα εκχυλίσματα οίνου διαθέτουν υψηλή βιοδραστικότητα που μπορεί να έχει μεγάλη προστιθέμενη αξία για τα Ελληνικά προϊόντα οίνου, τόσο για την εγχώρια αλλά κυρίως για τις διεθνείς αγορές. Επιπλέον ανοίγει μια νέα αγορά, αυτή των βιομηχανιών πρόσθετων τροφίμων και φαρμάκων, για τα εκχυλίσματα και τα μεμονωμένα βιονεργά μόρια.

Περισσότερες μελέτες τόσο σε αριθμό αλλά και πλήθος δειγμάτων που θα αξιολογούν διαφορετικές παρτίδες αυτών των ποικιλιών οίνου θα πρέπει επίσης να διεξαχθούν για να συγκεντρωθούν στοιχεία που θα χαρακτηρίσουν πλήρως τις βιολειτουργικές τους ιδιότητες.

Εν κατακλείδι, ένα σημαντικό ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης του οίνου μπορεί να αποδοθεί σε ενώσεις όπως το κουμαρικό και το καφταρικό οξύ, ενώ θα πρέπει να πραγματοποιηθούν μελέτες ADME (μελέτες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης) σε *in vivo* συστήματα για τον έλεγχο της βιοδιαθεσιμότητας αυτών των ενώσεων. Τέλος, η συσχέτιση της βιοδιαθεσιμότητας της της υψηλής αντιοξειδωτικής δράσης δεν έχει επιβεβαιωθεί και περαιτέρω μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της φαρμακοκινητικής, θα πρέπει να διεξαχθούν για να εκτιμηθεί η διατροφική αξία των φαινολικών ενώσεων καθώς και τα οφέλη από την δράση τους στις ασθένειες που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγή.

5 3^ο Επίπεδο αναλύσεων. Έλεγχος εκχυλισμάτων οίνων σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές

5.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός του 3^{ου} επιπέδου αναλύσεων είχε ως στόχο να εμβαθύνουν οι αναλύσεις στα 4 εκχυλίσματα οίνων, ώστε από το επίπεδο των *in vitro* τεχνικών να δοκιμαστούν σε ένα ζωντανό ευκαρυωτικό σύστημα, τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν σε ένα σύστημα 3 κυτταρικών σειρών, τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, τα καρκινικά ηπατοκύτταρα HepG2 και τα αδενοκαρκινικά κύτταρα στομάχου MKN45.

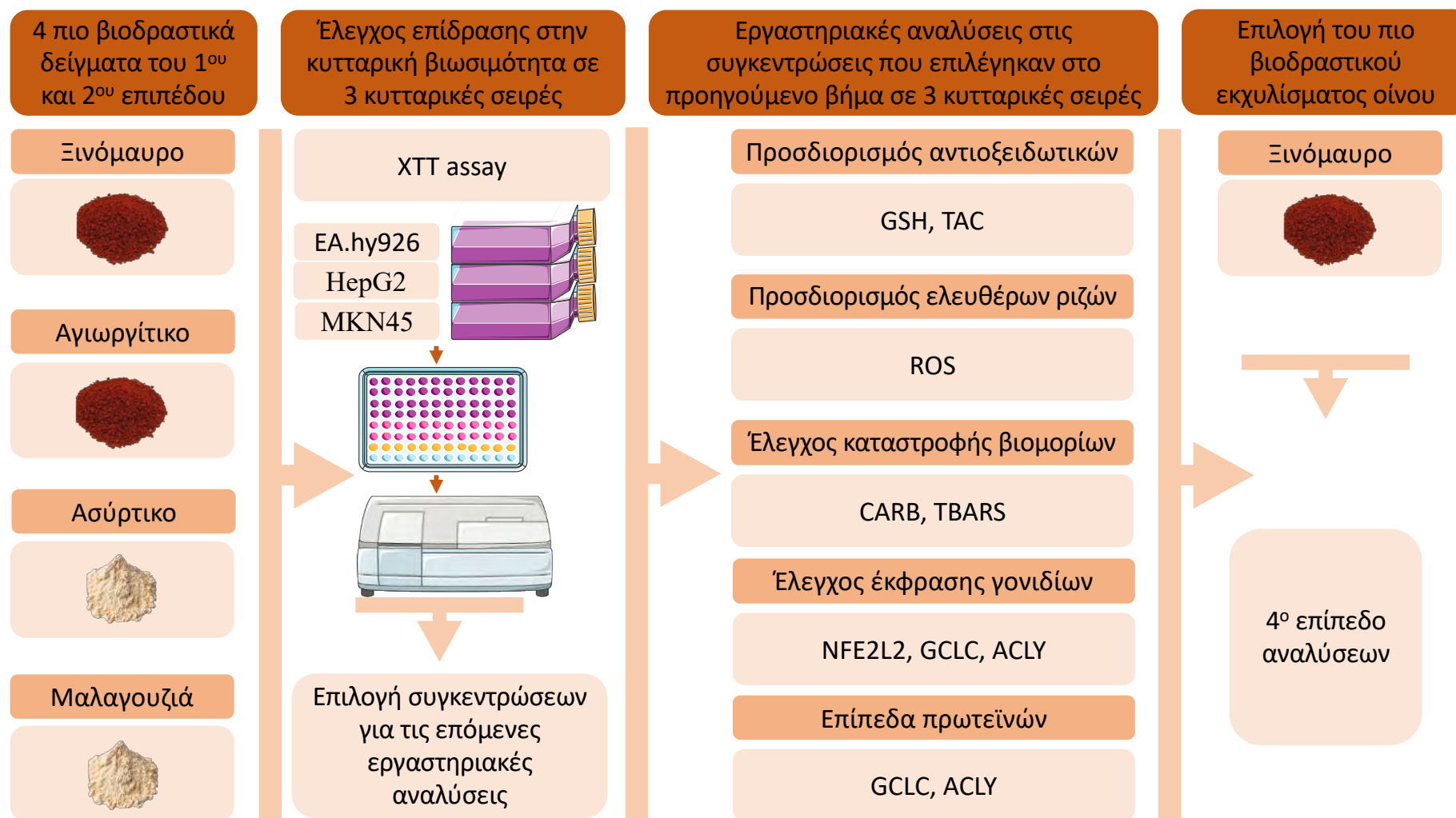
Τα εκχυλίσματα χορηγήθηκαν στις παραπάνω κυτταρικές σειρές και αρχικά έγινε έλεγχος επίδρασης στην κυτταρική βιωσιμότητα με τη δοκιμή XTT, ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για τις περαιτέρω αναλύσεις.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών καθώς και τα επίπεδα του κυριότερου αντιοξειδωτικού των κυττάρων, αυτού της γλουταθειόνης. Επιπλέον έγινε προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων (TAC), ενώ πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της καταστροφής βιομορίων, τόσο της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών (CARB) όσο και της οξείδωσης των λιπιδίων (TBARS).

Στα τελευταία στάδια του επιπέδου αυτού πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της έκφρασης κρίσιμων γονιδίων (NFE2L2, GCLC, ACLY) με real time PCR καθώς και προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνών GCLC και ACLY με Western plot.

Τα αποτελέσματα τόσο από το επίπεδο αναλύσεων 2, καθώς και από αυτό το επίπεδο, με τον έλεγχο της δράσης των εκχυλισμάτων σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές θα οδηγήσει στην επιλογή του πλέον βιοδραστικού από τα 4 εκχυλίσματα, το οποίο θα περάσει στο 4^ο επίπεδο αναλύσεων.

Η γραφική απεικόνιση του 3^{ου} επιπέδου αναλύσεων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 80: Γραφική απεικόνιση 3^{ου} Επιπέδου αναλύσεων.

5.2 Υλικά και μέθοδοι

5.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

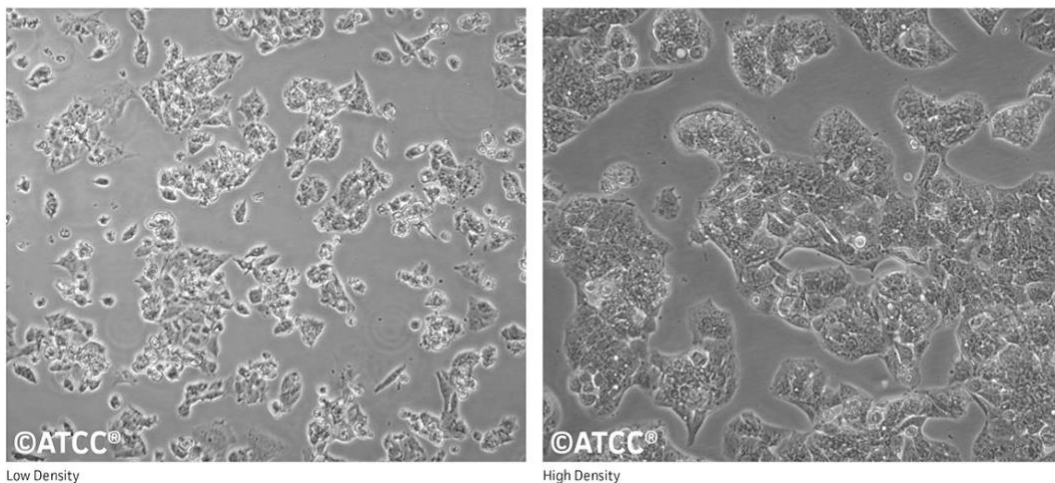
5.2.1.1 Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αξιολογήθηκε η επίδραση των 4 εκχυλισμάτων οίνων σε 3 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές εκ των οποίων 1 φυσιολογική και 2 καρκινικές. Οι σειρές που μελετήθηκαν αναλύονται στην συνέχεια.

5.2.1.2 Ανθρώπινα κύτταρα HepG2

Τα HepG2 είναι μια κυτταρική σειρά που παρουσιάζει μορφολογία που μοιάζει με επιθήλιο και απομονώθηκε από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ενός 15χρονου λευκού νεαρού με καρκίνο του ήπατος. Η κυτταρική σειρά διατέθηκε από το Ινστιτούτο Wistar και είναι κατάλληλος ξενιστής διαμόλυνσης. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν μια ποικιλία σημαντικών πρωτεϊνών πλάσματος, π.χ. αλβουμίνη, και πρωτεΐνες οξείας φάσης όπως ινωδογόνο, άλφα 2-μακροσφαιρίνη, άλφα 1-αντιτρυσίνη, τρανσφερίνη και πλασμινογόνο (Hep G2 [HEPG2] - HB-8065 | ATCC).

ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



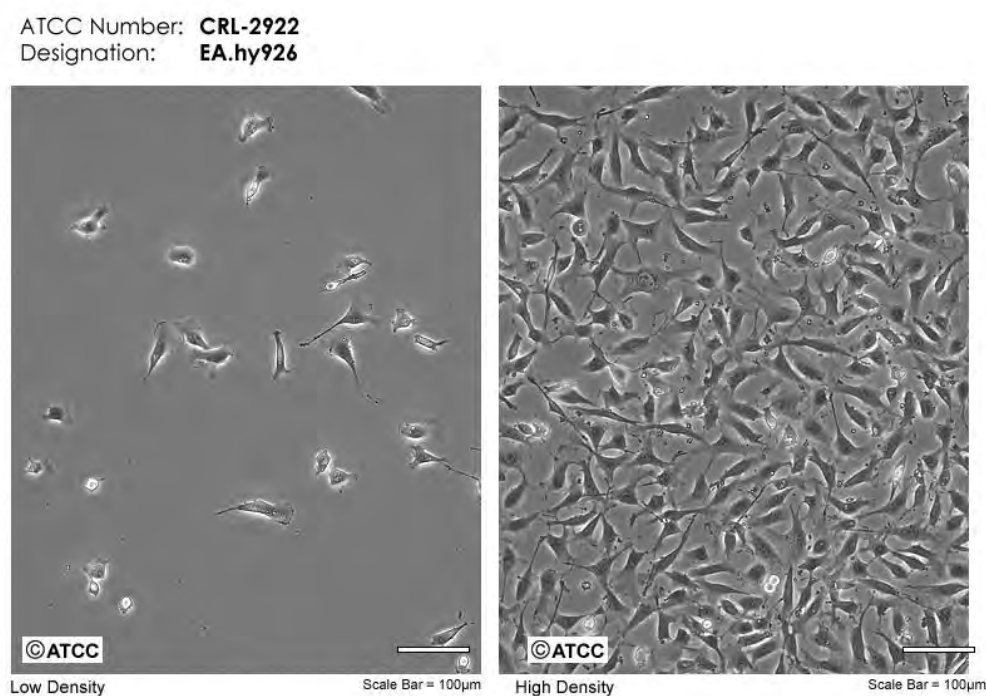
Εικόνα 81: Κύτταρα HepG2(Hep G2 [HEPG2] - HB-8065 | ATCC).

Πίνακας 24: Στοιχεία κυτταρικής σειράς HepG2.

Κατηγορία Προϊόντος	Ανθρώπινα κύτταρα
Οργανισμός προέλευσης	<i>Homo sapiens</i> , Άνθρωπος
Μορφολογία	Ομοιότητα με επιθήλιο
Ιστός προέλευσης	παρ
Ασθένεια	Καρκίνωμα, Ηπατοκαρκίνωμα

5.2.1.3 Ανθρώπινα κύτταρα EA.hy926

Η κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας, EA.hy926, δημιουργήθηκε με τη σύντηξη πρωτογενών κυττάρων ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας με έναν ανθεκτικό στη θειογουανίνη κλώνο του A549 με έκθεση σε πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Οι υβριδικοί κλώνοι επιλέχθηκαν σε μέσο HAT και ελέγχθηκαν για αντιγόνο σχετιζόμενο με τον παράγοντα VIII. Αυτή η κυτταρική σειρά κατατέθηκε από την CS Edgell(EA.Hy926 - CRL-2922 | ATCC).



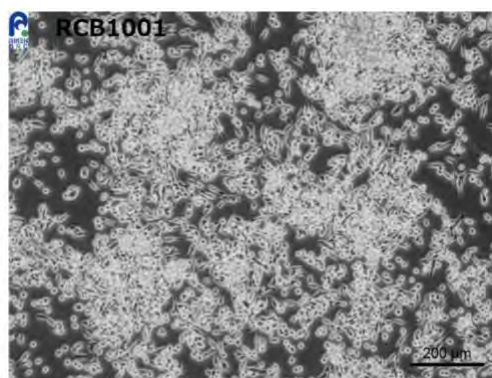
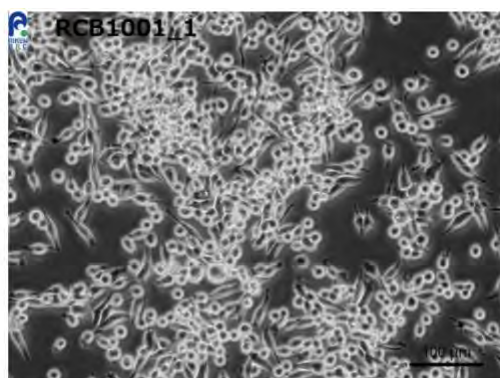
Εικόνα 82: Κύτταρα EA.hy926(EA.Hy926 - CRL-2922 | ATCC, n.d.).

Πίνακας 25: Στοιχεία κυτταρικής σειράς EA.hy926.

Κατηγορία Προϊόντος	Ανθρώπινα κύτταρα
Οργανισμός προέλευσης	<i>Homo sapiens</i> , Άνθρωπος
Μορφολογία	Ενδοθήλιο
Κυτταρικός τύπος	Υβριδικά σωματικά κύτταρα
Ασθένεια	-

5.2.1.4 Ανθρώπινα κύτταρα MKN45

Τα MKN45 δημιουργήθηκαν από διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα του στομάχου (μυελικός τύπος) γυναίκας 62 ετών με καταγωγή από την Ιαπωνία (CELL SEARCH SYSTEM -CELL BANK- (RIKEN BRC) [RCB1001 : MKN45]; Homma et al., 2006).



Εικόνα 83: Κύτταρα MKN45(CELL SEARCH SYSTEM -CELL BANK- (RIKEN BRC) [RCB1001 : MKN45], n.d.).

Πίνακας 26: Στοιχεία κυτταρικής σειράς MKN45.

Κατηγορία Προϊόντος	Ανθρώπινα κύτταρα
Οργανισμός προέλευσης	<i>Homo sapiens</i> , Άνθρωπος
Ιστός προέλευσης	Στόμαχος
Κυτταρικός τύπος	Υβριδικά σωματικά κύτταρα
Ασθένεια	Γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, μετάσταση από το ήπαρ στον στόμαχο

5.2.1.5 Συνθήκες καλλιέργειας

Λες οι κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε δοχεία δυναμικότητας 25 ή 75 cm². Το θρεπτικό υλικό για τις σειρές EA.hy926 και HepG2 είναι το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) και για την κυτταρική σειρά MKN45 το Roswell Park Memorial Institute (RPMI), τα οποία εμπεριέχουν ορό βοδινού (FBS, 10% v/v), 2 mM L-γλουταμίνη και 100 U/ml διάλυμα στρεπτομυκίνης/πενικιλίνης. Επιπλέον, το θρεπτικό για τα EA.hy926 περιέχει 25mM HEPES. Η επώαση και συντήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C και σταθερή συγκέντρωση 5% CO₂. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως ότου να καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας του δοχείου και στη συνέχεια ανακαλλιεργούνταν με την εκτέλεση της διαδικασίας της θρυψινοποίησης.

Για τη διαδικασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο θρυψίνη (0,25%) για 2-3 λεπτά στους 37°C, το οποίο έχει την ικανότητα να κόβει τους δεσμούς των κυττάρων με την επιφάνεια της φλάσκας και φέρει τα κύτταρα σε αιώρημα. Στη συνέχεια προστέθηκαν DMEM ή RPMI με FBS για να αδρανοποιηθεί το ένζυμο και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέες φλάσκες με νέο θρεπτικό.

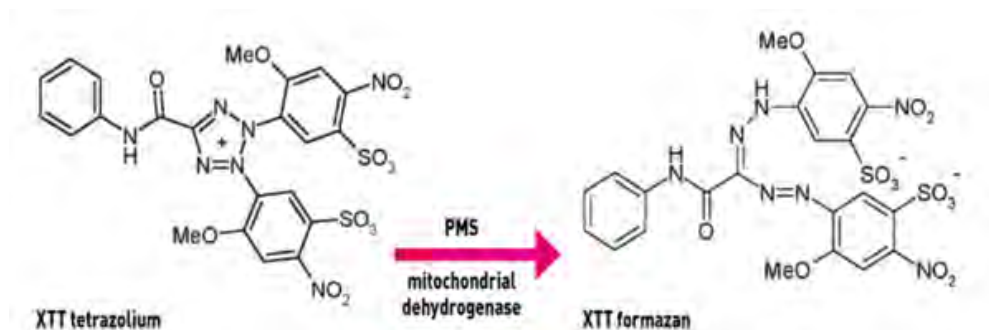
Οι συνθήκες στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών ήταν πλήρως ασηπτικές, καθώς όλες οι διεργασίες εκτελέστηκαν σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφαλείας 2 με σκοπό την προστασία του χρήστη, του περιβάλλοντα χώρου και του δείγματος. Οι κυτταρικές σειρές σε όλη την περίοδο των δοκιμών υπόκειντο σε έλεγχο για επιμόλυνση μυκοπλάσματος με PCR, κάθε 3-4 περάσματα.

5.2.2 Προσδιορισμός των κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο XTT

Η μέθοδος XTT χρησιμοποιήθηκε με στόχο την επιλογή των μη τοξικών συγκεντρώσεων για τα κύτταρα ώστε να μελετηθεί η επίδραση τους στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Η μέθοδος είναι χρωματομετρική και προσδιορίζει ποσοτικά την κυτταρική βιωσιμότητα με βάση τη μεταβολική ενεργότητα.

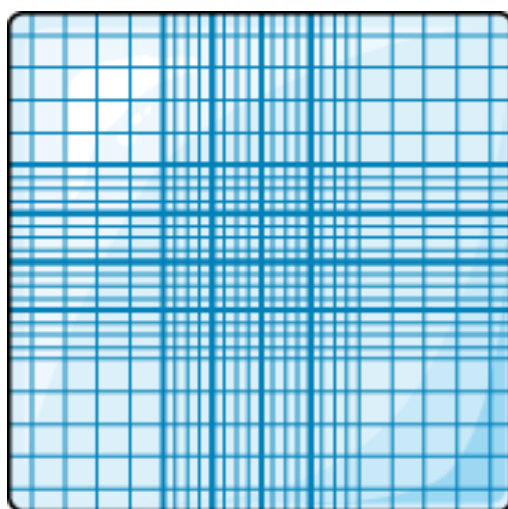
Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμεωνιακού άλατος XTT στην αντίστοιχη φορμαζάνη από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Η φορμαζάνη έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450 nm.

Μία τοξική συγκέντρωση από κάποιο δείγμα, όπως στην προκειμένη περίπτωση ένα εκχύλισμα οίνου, μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και συνεπώς την παρατηρούμενη απορρόφηση (A. Veskoukis et al., 2019).



Εικόνα 84: Μετατροπή του XTT στην αντίστοιχη φορμαζίνη (Κούκα, 2020).

Την πρώτη ημέρα του πειράματος, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό, μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης και μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer, με σκοπό την καταμέτρηση τους, ώστε να υπολογιστεί πόσα μl έπρεπε να επιστρωθούν σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας 96 θέσεων, για να υπάρχουν 10.000 κύτταρα σε αυτά. Από το επαναιώρημα των κυττάρων, συλλέχθηκαν 10 μl και τοποθετήθηκαν ανάμεσα από την καλυπτρίδα και την πλάκα Neubauer. Ακολούθησε καταμέτρηση των κυττάρων στα τέσσερα γωνιακά τετράγωνα. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος [έστω: $\mu.o. = (\alpha + \beta + \gamma + \delta) / 4$] και στην συνέχεια πολλαπλασιάστηκε με το 10.000 [έστω $\mu.o. * 10.000 = X$] προκειμένου να υπολογιστεί ο αριθμός των κυττάρων ανά ml. Ακολούθως υπολογίσθηκαν τα μl του επαναιωρήματος που περιείχαν 10.000 κύτταρα.



Εικόνα 85: Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer.

Μετά την προσθήκη των κυττάρων σε κάθε οπή προστέθηκαν DMEM ή RPMI με FBS και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C. Τη δεύτερη ημέρα απομακρύνθηκε το θρεπτικό και προστέθηκε νέο χωρίς FBS (καθώς το FBS αλληλοεπιδρά με τις φαινόλες και επηρεάζει τη δράση τους) καθώς και εύρος συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων και οι πλάκες επωάσθηκαν για άλλες 24 ώρες στους 37°C. Την τρίτη ημέρα έγινε προσθήκη 50 μl του αντιδραστηρίου XTT σε κάθε πηγαδάκι και οι πλάκες επωάσθηκαν για άλλες 4 ώρες στον κλίβανο στους 37°C. Στο τέλος του τετράωρου έγινε φωτομέτρηση στα 450 nm και 630 nm (μήκος κύματος αναφοράς) σε ELISA plate reader. Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Gen5. Η μέτρηση στα 630 nm βοήθησε στην κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών πηγαδιών κάθε πλάκας και αφαιρέθηκε η τιμή της από την τιμή των 450 nm. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η οπή που περιείχε κύτταρα χωρίς την προσθήκη εκχυλίσματος οίνου, ενώ κάθε συγκέντρωση με προσθήκη εκχυλίσματος οίνου περιλάμβανε και την αντίστοιχη οπή με τυφλό διάλυμα στο οποίο απουσίαζαν τα κύτταρα, έτσι ώστε να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση που μπορεί να προκύψει μόνο από το θρεπτικό ή/και το εκχύλισμα. Το πείραμα έγινε σε 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις.

Η % βιωσιμότητα των κυττάρων (μετά την αφαίρεση των τυφλών) προκύπτει από τον ακόλουθο τύπο, όπου Abs = οπτική απορρόφηση:

$$\% \text{ Βιωσιμότητα} = [(Abs \text{ μάρτυρα} - Abs \text{ δείγματος}) / Abs \text{ μάρτυρα}] \times 100\%$$

5.2.3 Χορήγηση εκχυλισμάτων στις κυτταρικές σειρές

Με σκοπό την αξιολόγηση των δεικτών της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων μετά από τη χορήγηση των 4 εκχυλισμάτων οίνων (Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο, Μαλαγουζιά) χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά μεγέθη δοχείων (25 cm² και 75 cm²), ανάλογα με τις απαιτήσεις της κάθε τεχνικής σε πρωτεϊνικά επίπεδα. Οι φλάσκες των 25 cm² χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής, για τον προσδιορισμό των ενδογενών επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα δοχεία των 75 cm² χρησιμοποιήθηκαν:

α) για τις φωτομετρικές τεχνικές:

Ο προσδιορισμός των επιπέδων ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

- ο προσδιορισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS)
- ο προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνικής καρβονυλίωσης (CARB)

β) για την αποτίμηση της γονιδιακής έκφρασης σε πραγματικό χρόνο με Real-Time PCR (qPCR).

γ) για τον υπολογισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων μέσω ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot).

Η προσθήκη των τεσσάρων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε έπειτα από την πλήρωση του εκάστοτε δοχείου με κύτταρα στο 70-80%, σε DMEM ή RPMI ανάλογα με την κυτταρική σειρά χωρίς FBS στους 37°C, για 24 ώρες. Μετά την επώαση στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση, φυγοκέντρηση (300g, 10 min, 4°C), ξέπλυμα με PBS και δεύτερη φυγοκέντρηση (300g, 10 min, 4°C). Μετά και την δεύτερη φυγοκέντρηση το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε PBS. Για την κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε χρώση του ιζήματος με τις αντίστοιχες χρωστικές για κάθε δείκτη, ενώ για τις υπόλοιπες τεχνικές έγινε λύση με υπερήχους για 1 λεπτό (70% amplitude, 0,7 sec κύκλος) και προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων με τη μέθοδο Bradford. Για την qPCR, το ίζημα λύθηκε μέσω kit.

5.2.4 Κυτταρομετρία ροής

Με την τεχνική αυτή ελέγχονται αυτόματα οι φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων. Για να επιτευχθεί ο στόχος αυτός, τα κύτταρα προσροφώνται σε κυτταρόμετρο ενώ βρίσκονται σε εναιώρημα που έχει την ικανότητα να μετρά και να αναλύει περισσότερα από 1000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο. Κάθε κύτταρο εστιάζεται σε μία δέσμη λέιζερ με την βοήθεια της υδροδυναμικής ροής και η σκέδαση της δέσμης ανιχνεύεται από αντίστοιχους αισθητήρες. Η τεχνική βασίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης του φωτός που μπορεί να διεγείρει κύτταρα μεταξύ 0,2 – 150 μm. Επίσης βασίζεται στις χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των GSH και ROS που απορροφούν την ακτινοβολία λέιζερ και εκπέμπουν φως σε άλλο μήκος κύματος από αυτό που εκπέμπει η πηγή του κυτταρομέτρου. Όλες οι πληροφορίες που συλλέγονται από το κυτταρόμετρο αναλύονται από το λογισμικό πρόγραμμα BD Cell Quest. Οι πληροφορίες αυτές αφορούν κυρίως το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των κυττάρων αλλά και τα επίπεδα φθορισμού που καταγράφηκαν από τη χρωστική. Η

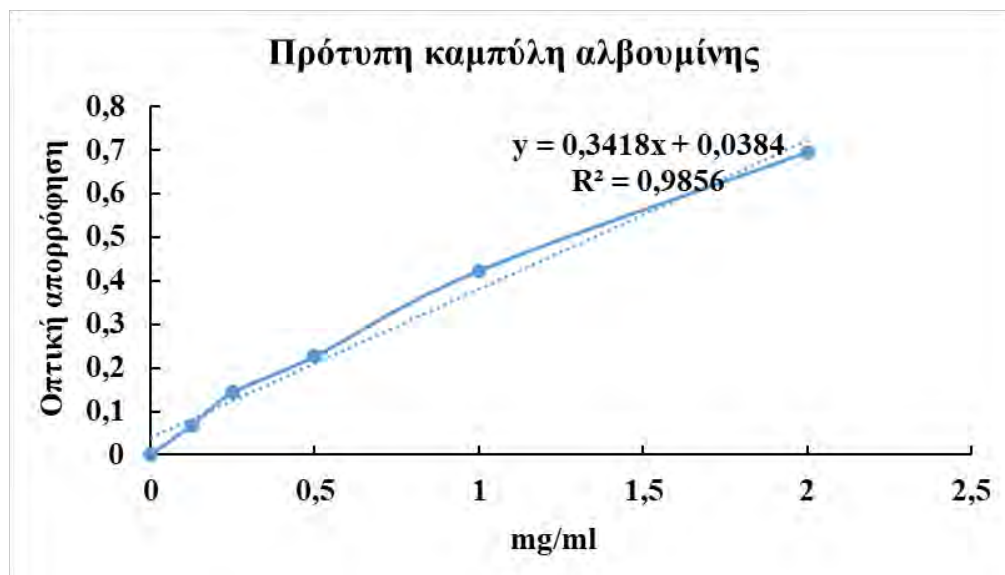
εμπρόσθια σκέδαση (Forward Scattering, FSC) αφορά τον όγκο του κυττάρου ενώ η πλάγια (Side Scattering, SSC) σχετίζεται με την εσωτερική πολυπλοκότητά του.

Για τη μέτρηση της γλουταθειόνης χρησιμοποιήθηκε η χρωστική mercury orange η οποία έχει την ιδιότητα να συνδέεται απευθείας με τη γλουταθειόνη και να εκπέμπει φθορισμό. Αντίθετα, για την μέτρηση των ROS χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DCF-DA. Η ουσία αυτή αρχικά αποακετυλιώνεται μέσα στα κύτταρα από εστεράσες και στη συνέχεια οι ROS την οξειδώνουν με αποτέλεσμα να προκύπτει η ουσία DCF η οποία έχει την ιδιότητα να φθορίζει. Για κάθε χρωστική δημιουργήθηκε κυτταρικό αιώρημα σε PBS και προστέθηκαν είτε 10μM mercury orange είτε 10μM DCF-DA αντίστοιχα για κάθε δείκτη που αξιολογήθηκε. Μετά την προσθήκη της χρωστικής ακολούθησαν 30 λεπτά επώαση στον κλίβανο στους 37°C. Στην συνέχεια ακολούθησε πλύση με PBS και φυγοκέντρηση (300 g, 5 min, 4 °C), απομάκρυνση του υπερκείμενου με την περίσσεια χρωστικής και νέα επαναδιάλυση σε PBS. Τα δείγματα μετά την παραπάνω διαδικασία ήταν έτοιμα για μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής FACScalibur με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 580 nm για την GSH και 488 και 530 nm για τις ROS. Επιπλέον προσδιορίστηκε η εμπρόσθια και πλάγια σκέδαση με σκοπό την ανάλυση του μεγέθους και της πολυπλοκότητας των κυττάρων. Για κάθε εξεταζόμενο δείγμα έγινε ανάλυση σε 10.000 κύτταρα και το πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον 3 φορές για κάθε συγκέντρωση.

5.2.5 Υπολογισμός ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μέσω του αντιδραστήριου Bradford

Για την εκτίμηση της ολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford (100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml 95% αιθανόλη, 100 ml 85% (w/v) φωσφορικό οξύ, dH₂O μέχρι το 1L). Η Coomassie Brilliant Blue G-250 δημιουργεί σύμπλοκα με αμινοξέα το οποίο έχει μέγιστη οπτική απορρόφηση στα 595nm. Σε τελικό όγκο 1 ml προστέθηκαν 20 μl δείγματος και 980 μl από αντιδραστήριο Bradford, και ακολούθησε 15 λεπτά επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα μόνο με PBS.

Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης, με συγκεντρώσεις από 0,125 έως και 10 mg/ml δίνοντας την εξίσωση $y = 0,3418x + 0,0384$ όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 86: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.

5.2.6 Υπολογισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσής (TBARS)

Ο προσδιορισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσής προσδιορίστηκε με την μέθοδο Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). Όταν οξειδώνονται τα λιπίδια δημιουργούνται παραπροϊόντα με σημαντικότερο την μηλονική διαλδεύδη (Malondialdehyde, MDA). Το παραπροϊόν αυτό αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ σε αναλογία 1:2 δίνοντας ένα χρωμοφόρο προϊόν που απορροφά στα 530 nm (Patsoukis et al., 2004; A. Veskoukis et al., 2019).

Πιο αναλυτικά, με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε η ποσότητα του κυτταρολύματος που περιέχει 100 μg πρωτεΐνη και σε στην αυτή ποσότητα προστέθηκε PBS μέχρι τα 400 μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4) και 500 μl τριχλωροξικού οξέος (TCA) 35%. Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 min σε 25°C και στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml διαλύματοςθειικού νατρίου και θειοβαρβιτουρικού οξέος (2M Na₂SO₄, 55 mM TBA). Μετά από ανάδευση, τα δείγματα επώαστηκαν για 45 min σε υδατόλουτρο στους 95°C και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 min. Ακολούθησε προσθήκη 1 ml διαλύματος TCA 70%, ανάδευση, φυγοκέντρωση (11200g, 3min, 4°C) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης

του υπερκειμένου στα 530 nm. Σε κάθε πείραμα ο μάρτυρας περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός του κυτταρικού αιωρήματος, ενώ κάθε δείγμα ελέγχθηκε 3 φορές.

Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε ως nmol TBARS ανά mg πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίστηκε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA. Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$TBARS \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \left(\frac{\frac{A_{\delta} - A_0}{1,56 \times 10^5}}{\text{Πρωτεΐνη δείγματος} \left(\frac{mg}{mL} \right)} \right) \times \left(\frac{3400}{V_{\delta}} \right)$$

A_{δ} : Η οπτικής απορρόφηση του δείγματος

A_0 : Η οπτική απορρόφηση του τυφλού

$1,56 \times 10^5$: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA ($M^{-1} \times cm^{-1}$)

3400: Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης σε ml

V_{δ} : Ο όγκος (σε ml) του εκάστοτε κυτταρικού αιωρήματος ώστε η αντίδραση να έχει 100 μg πρωτεΐνης

5.2.7 Υπολογισμός των επιπέδων οξείδωσης των πρωτεϊνών μέσω πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων γίνεται με την αλληλεπίδραση τους με την χρωστική DNPH (δινιτροφαινυλδραζίνη) η οποία δημιουργεί ένα προϊόν που απορροφά στα 375nm. Με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε η ποσότητα του κυτταρολύματος που περιέχει 100 μg πρωτεΐνη και σε αυτή την ποσότητα προστέθηκε PBS μέχρι τα 400μl (για κάθε δείγμα δημιουργήθηκε και το αντίστοιχο τυφλό χωρίς προσθήκη κυττάρων) (Patsoukis et al., 2004; A. Veskoukis et al., 2019). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 500 μl DNPH (10 mM διαλυμένου σε HCl 2,5M) για τα δείγματα και 500 μl HCl (2.5M) για τα τυφλά. Ακολούθως τα δείγματα επώασθηκαν για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύονταν με vortex ανά 15 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, προστέθηκαν 100 μl TCA 100% και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (15.000g, 5 λεπτά, 4°C). Το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε και πραγματοποιήθηκαν 3 στάδια πλύσης με 1 ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1 v/v) και φυγοκέντρηση (15000 g, 5 λεπτά, 4°C) με απομάκρυνση του υπερκειμένου μετά από κάθε πλύση. Στο τέλος της 3^{ης} πλύσης και μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου στο ίζημα προστέθηκαν 1 ml ουρίας (5M, pH = 2,3) και όλα τα δείγματα επώασθηκαν στους 37°C

για επιπλέον 15 λεπτά. Μετά την επώαση πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση (15000g, 3 λεπτά, 4°C) και τα δείγματα ήταν έτοιμα για φωτομέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 375 nm. Η συγκέντρωση των καρβονυλίων υπολογίστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$CARB \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \left(\frac{\frac{A_{\delta} - A_0}{0,022}}{\text{Πρωτεΐνη δείγματος} \left(\frac{mg}{mL} \right)} \right) \times \left(\frac{1000}{V_{\delta}} \right)$$

A_{δ} : Η οπτική απορρόφηση του δείγματος

A_0 : Η οπτική απορρόφηση του τυφλού

0,022: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH ($M^{-1} \times cm^{-1}$)

1000: Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης σε μl

V_{δ} : Ο όγκος (σε μl) του εκάστοτε κυτταρικού αιωρήματος ώστε η αντίδραση να έχει 100 μg πρωτεΐνης

5.2.8 Προσδιορισμός συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η TAC στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνου που υπάρχει στο κυτταρόλυμα, η παραπάνω ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm (A. Veskoukis et al., 2019).

Πειραματική διαδικασία:

Με βάση τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος που να αντιστοιχεί σε 100 μg πρωτεΐνης και αναμίχθηκε με PBS έως τελικού όγκου 400 μl.

1. Προστέθηκαν οι παρακάτω ποσότητες σε σωλήνες των 1,5ml:

Πίνακας 27: Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

	Τυφλό δείγμα	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μl	450 μl
DPPH 0.1 mM	500 μl	500 μl
Κυτταρικό αιώρημα	-	50 μl

2. Vortex

3. Επώαση στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του κυτταρικού αιωρήματος εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στο πιο σταθερό παράγωγο της υδραζίνης.
4. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 20.000g στους 25°C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση).
5. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 520nm με πλαστική κυψελίδα.

Υπολογισμοί:

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} * 100$$

ii) $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{ml αιωρήματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) * 50 * 20] / 1000$

α) Διαίρεση με το 100 με σκοπό να μετατραπεί η ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιασμός με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιασμός με το 20 διότι η αραιώση του αιωρήματος στην κυψελίδα είναι 20-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 50 μL κυτταρικού αιωρήματος του δείγματος στην κυψελίδα = 20).

δ) Διαίρεση με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του αιωρήματος σε mL ορού.

Παράδειγμα: Εάν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL αιωρήματος είναι: $20 / 100 * 50 * 20 / 1000 = 0.2 \mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL αιωρήματος}$ ή $0.2 \text{ mmol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{L πλάσματος}$ ή 0.2 mmol DPPH/L .

5.2.9 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων με Real Time PCR

5.2.9.1 Απομόνωση ολικού RNA και δημιουργία cDNA

Για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα έγινε χρήση εμπορικού κιτ. Αρχικά πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων μέσω ειδικού διαλύματος παρουσία μερκαπτοαιθανόλης. Στη συνέχεια έγινε κατακρήμνιση του DNA και του RNA με τη βοήθεια αιθανόλης τα οποία δεσμεύθηκαν από θετικά φορτισμένες μεμβράνες. Τέλος

ακολούθησε έκλυση του DNA και του RNA, ενώ το πρώτο αποικοδομήθηκε από DNAσες.

Ο έλεγχος της ποσότητας του RNA έγινε με φωτομέτρηση στα 260nm. Τιμή απορρόφησης 1 υποδηλώνει συγκέντρωση RNA 40 µg/ml ενώ ο έλεγχος για την παρουσία πρωτεϊνών έγινε με φωτομέτρηση στα 280nm και υπολογισμός του λόγου των απορροφήσεων σε 260nm/280nm. Οι επιθυμητές τιμές είναι οι μεγαλύτερες από 1,8.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετατροπή του mRNA σε cDNA. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές oligo-dTs που υβριδίζονται με την πολυαδενυλική ουρά των mRNA και αναγνωρίζονται από την αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία με τη σειρά της μετατρέπει το mRNA σε cDNA

5.2.9.2 Ποσοτικός προσδιορισμός έκφρασης γονιδίων

Τα δείγματα που προέκυψαν με την παραπάνω διαδικασία αξιολογήθηκαν με real-time PCR για την ποσοτική ανάλυση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε με την ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδίων που επιλέγονται με την χρήση συγκεκριμένων εκκινητών και της SYBR Green, μιας φθορίζουσας χρωστικής. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδεθεί πάνω σε δίκλωνα τμήματα DNA απορροφώντας στα 492nm, ενώ εκπέμπει στα 516nm. Σε κάθε κύκλο της Real Time PCR προσδιορίζεται ο φθορισμός που εκπέμπεται. Στους πρώτους κύκλους ο φθορισμός που εκπέμπεται από την SYBR Green δεν είναι αρκετός για να περάσει την ουδό (Ct – Cycle Threshold). Το Ct είναι ανάλογο της αρχικής ποσότητας DNA του δείγματος και συγκεκριμένα όσο πιο χαμηλό είναι, τόσο περισσότερα αντίγραφα DNA (και άρα του εξεταζόμενου mRNA) υπήρχαν αρχικά (Ponchel et al., 2003).

Με σκοπό τη σύγκριση των επιπέδων του mRNA μεταξύ των κυττάρων στα οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα οίνου και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου έπρεπε να γίνει κανονικοποίηση στα αποτελέσματα σε κάθε δείγμα με ένα γονίδιο αναφοράς. Στην συγκεκριμένη αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH). Κάθε γονίδιο αναφοράς έπρεπε να έχει υψηλά επίπεδα έκφρασης σε κάθε κυτταρικό τύπο και να μην επηρεάζονται από εξωγενείς παράγοντες (Huggett et al., 2005).

Για την ενίσχυση όλων των τμημάτων χρησιμοποιήθηκαν 10 µl που περιείχαν SYBR® Select Master Mix (2X), 0,25 µM από τον κάθε εκκινητή, 50 nM ROX Low και 25 ng cDNA. Οι εκκινητές βασίστηκαν στη βιβλιογραφία και οι αλληλουχίες τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad CFX connect system ήταν οι ακόλουθες: 3 λεπτά στους 95 °C, 45 κύκλοι (15 δευτερόλεπτα στους 95 °C, 30 δευτερόλεπτα στους 55°C). Τέλος, πραγματοποιήθηκε και καμπύλη αποδιάταξης από τους 53°C έως και τους 95°C για να ελεγχθεί η ειδικότητα της σύνδεσης των εκκινητών.

Πίνακας 28: Αλληλουχίες εκκινητών.

Genes	Primers (5'-3')
NFE2L2	Forward
	ATTGCCTGTAAGTCCTGGTCA
	Reverse
	ACTGCTCTTTGGACATCATTTTCG
GCLC	Forward
	GAAGAAGATATTTTCCTGTCATTGAT
	Reverse
	CCATTCATGTATTGAAGAGTGAATTT
ACLY	Forward
	TGAGGAAGCATCCGGAGGTA
	Reverse
	TCCGATGATGGTCACTCCCT
GAPDH	Forward
	TGCACCACCAACTGCTTAG
	Reverse
	GATGCAGGGATGATGTTC

5.2.10 Αποτίμηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (western blot)

Η μέθοδος Western blot χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, 30μg πρωτεΐνης προστέθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης (Laemmli buffer 6x) και επώασθηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία 95°C. Στη συνέχεια, το κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 8% με διατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) με σκοπό να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες. Η ηλεκτροφόρηση κράτησε για 1 ώρα σε 150 Volt. Με το τέλος της μίας ώρας, έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF με τη διαδικασία της υγρής μεταφοράς. Πιο αναλυτικά, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε κασετίνα που περιείχε τα παρακάτω:

1. Σφουγγάρι
2. Διηθητικό χαρτί Whatman
3. Το πήκτωμα
4. Την μεμβράνη PVDF
5. Διηθητικό χαρτί Whatman
6. Σφουγγάρι

Η κασετίνα με τα παραπάνω υλικά τοποθετήθηκε στην συνέχεια σε συσκευή ηλεκτροφόρησης για χρονική διάρκεια 2 ωρών σε 110 Volt. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη επώασθηκε για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C με αποβουτυρωμένο γάλα 5% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X (Tris, NaCl, TWEEN 20). Το γάλα χρησιμοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες του μπλοκάρουν τις μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης. Η μεμβράνη ήταν έτοιμη να επωαστεί με τα αντισώματα που ενδιαφέρουν: το πρωτογενές αντίσωμα για GCLC (πολυκλωνική IgG κουνελιού, #H2905, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) και ACLY (μονοκλωνική IgG κουνελιού, #ab40793, Abcam, 1:2000) τοποθετήθηκε για χρονική διάρκεια μίας ώρας σε διάλυμα TBST 1X με 5% w/v γάλα. Στη συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις (5 συνολικά) χρονικής διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία με TBST ενώ μετά η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε TBST με 5% γάλα για 30 min με το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με HRP (συζευγμένο IgG κατσίκας κατά κουνελιού (H+L)-HRP #31462, Thermo Scientific, 1:5000). Ακολούθησαν εκ νέου πλύσεις (3 συνολικά) με TBST για 15 λεπτά. Τέλος η μεμβράνη εκτέθηκε στο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας (ECL) για 1 λεπτό μέσα σε ειδικό φάκελο όπου και πραγματοποιήθηκε εμφάνιση των ζωνών των πρωτεϊνών σε

φίλμ αυτοραδιογραφίας μέσα σε θάλαμο απουσία φωτός. Η πρωτεΐνη GAPDH (αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης) αποτέλεσε το μόριο κανονικοποίησης. Τα σχετικά επίπεδα των ζωνών ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση λογισμικού Alpha Innotech.

5.2.11 Στατιστική Ανάλυση

Το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της μέσης τιμής κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος οίνου με τη μέση τιμή της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος $\pm$ το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM) και σημαντικές θεωρούνται οι διαφορές $p < 0,05$. λες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism έκδοση 9 για MAC OS, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Έλεγχος επίδρασης της κυτταρικής βιωσιμότητας

Οι επιδράσεις των 4 εκχυλισμάτων οίνου στην κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο του XTT στις 3 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HepG2, EA.hy926 και MKN45. Πιο συγκεκριμένα, κάθε εκχύλισμα οίνου χορηγήθηκε σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 1 $\mu\text{g/ml}$ έως 800 $\mu\text{g/ml}$ και προσδιορίστηκε το κυτταροτοξικό κατώφλι. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα τόσο από τους ερυθρούς όσο και από τους λευκούς οίνους ήταν περισσότερο κυτταροτοξικά στα MKN45 και παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα στα 50 $\mu\text{g/ml}$. Επιπλέον, το Ξινόμαυρο και το Αγιωργίτικο παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα στα 100 $\mu\text{g/ml}$, ενώ το Ασύρτικο και η Μαλαγουζιά παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα στα 800 $\mu\text{g/ml}$ στα κύτταρα HepG2. Τέλος, τα εκχυλίσματα από όλες τις ποικιλίες οίνου παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα στα 100 $\mu\text{g/ml}$ στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Τα αποτελέσματα με τις κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των τεσσάρων εκχυλισμάτων στις 3 κυτταρικές σειρές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 29: Το κυτταροτοξικό όριο ($\mu\text{g/ml}$) για κάθε εκχύλισμα οίνου στις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές.

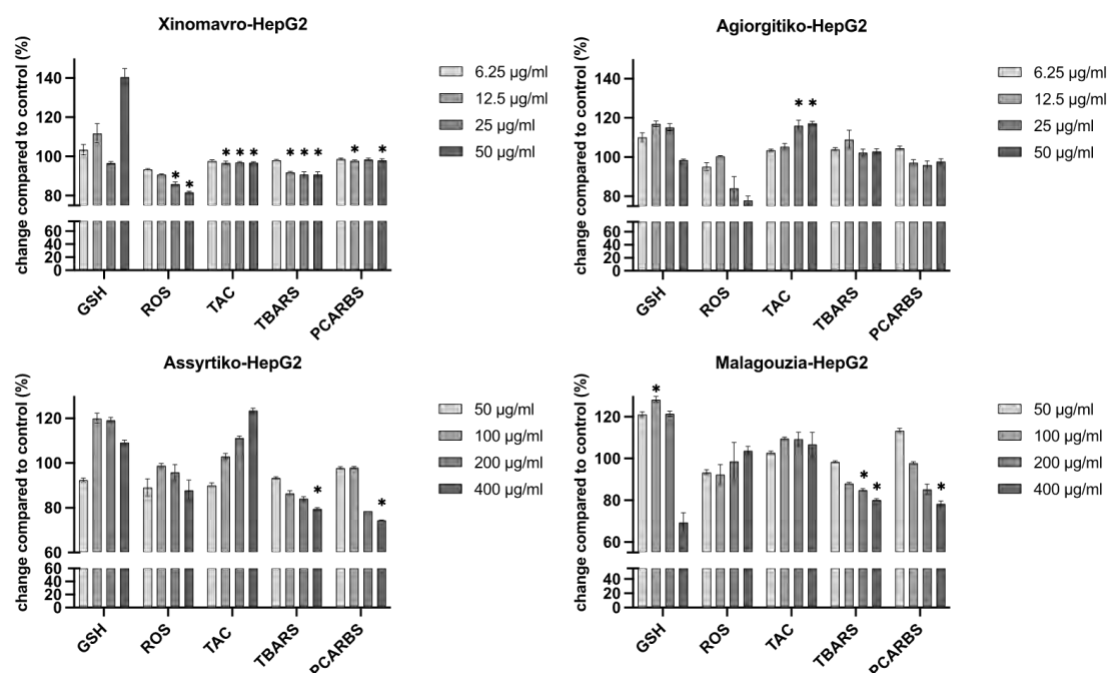
Κυτταρικές σειρές	Εκχυλίσματα	Κυτταροτοξική συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$)
HepG2	Ξινόμαυρο	100
	Αγιωργίτικο	100
	Ασύρτικο	800
	Μαλαγουζιά	800
EA.hy926	Ξινόμαυρο	100
	Αγιωργίτικο	100
	Ασύρτικο	100
	Μαλαγουζιά	100

Κυτταρικές σειρές	Εκχυλίσματα	Κυτταροτοξική συγκέντρωση (μg/ml)
MKN45	Ξινόμαυρο	50
	Αγιωργίτικο	50
	Ασύρτικο	50
	Μαλαγουζιά	50

5.3.2 Αποτελέσματα κυτταρικών καλλιιεργειών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης μετά την επεξεργασία εκχυλισμάτων οίνου

5.3.2.1 Επίπεδα βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε κύτταρα HepG2

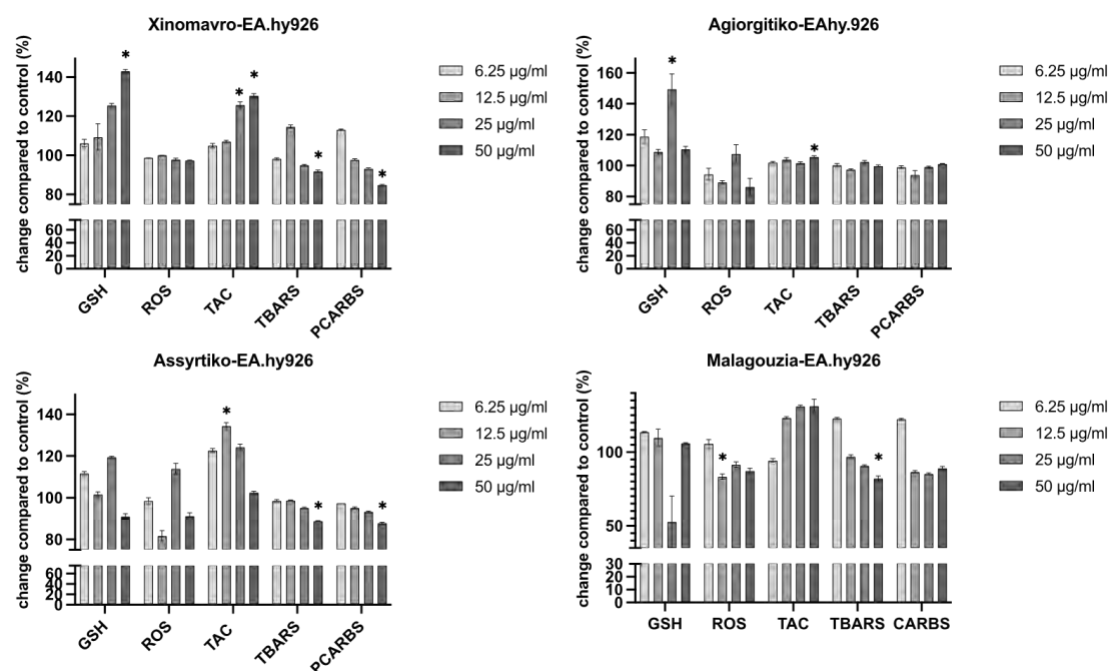
Η ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής έδειξε μεταβολές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS. Το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, το Ξινόμαυρο εκχύλισμα μείωσε τα επίπεδα των ROS σε κύτταρα HepG2 για συγκεντρώσεις ίσες με 25 και 50 μg/ml, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου που δεν καλλιεργήθηκαν με το εκχύλισμα ($p < 0,05$). Οι 3 μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος αυτού προκάλεσαν μείωση των επιπέδων TAC και TBARS, ενώ στις συγκεντρώσεις των 12,5 και 50 μg/ml εμφανίστηκε μείωση των επιπέδων των CARBS. Στον αφορά το εκχύλισμα του Αγιωργίτικου, αυτό αύξησε τα επίπεδα της TAC στα 25 και 50 μg/ml, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ($p < 0,05$). Στον αφορά τα εκχυλίσματα που προήλθαν από τους λευκούς οίνους παρατηρήθηκε ότι το Ασύρτικο μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των TBARS και CARBS των κυττάρων HepG2 στην συγκέντρωση 400 μg/ml ($p < 0,05$). Τέλος, το εκχύλισμα της Μαλαγουζιάς αύξησε τα επίπεδα GSH στα 100 μg/ml, στα 400 μg/ml μείωσε τα επίπεδα TBARS και CARBS, ενώ στα 200 μg/ml μείωσε μόνο τα επίπεδα TBARS ($p < 0,05$). Τα αποτελέσματα με τις δράσεις των 4 εκχυλισμάτων οίνων στα επίπεδα των 5 βιοδεικτών (GSH, ROS, TAC, TBARS, P. CARBS) που αξιολογήθηκαν στην κυτταρική σειρά HepG2 παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 87: Οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων οίνου Ξινόμαυρο (Α), Αγιωργίτικο (Β), Ασύρτικο (Γ) και Μαλαγουζιά (Δ) στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής στην κυτταρική σειρά HepG2. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και σε τέσσερις ανεξάρτητες περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

5.3.2.2 Επίπεδα βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε κύτταρα EA.hy926

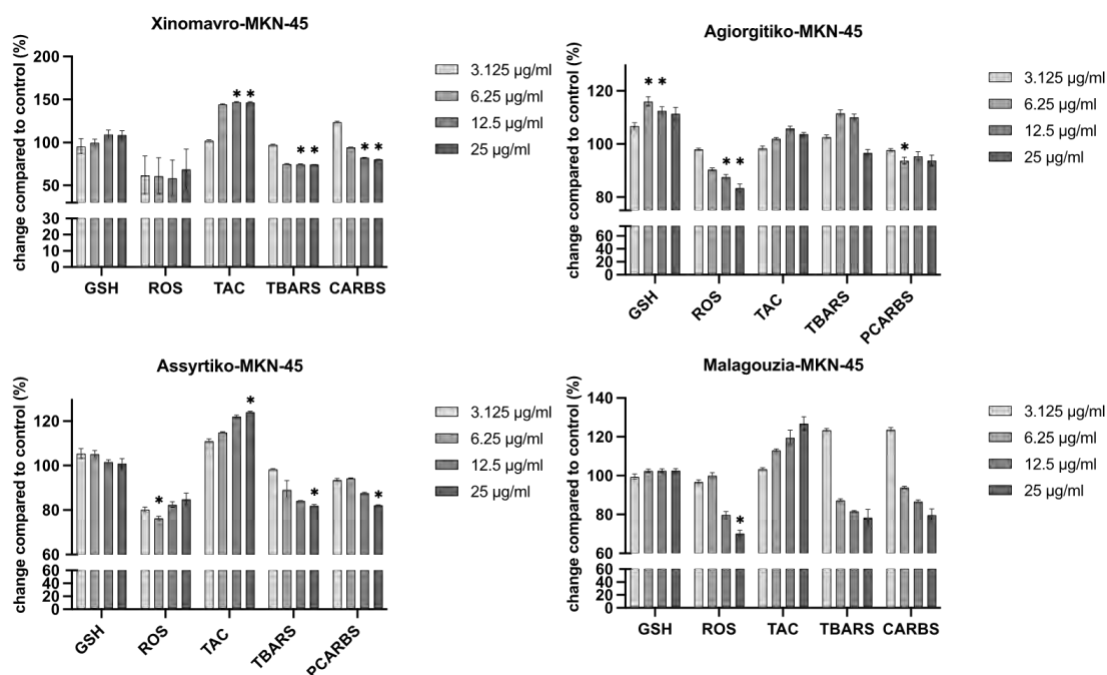
σον αφορά τις επιδράσεις στα κύτταρα EA.hy926, το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου αύξησε τα επίπεδα GSH μόνο στα 50 µg/ml, ενώ το Αγιωργίτικο στα 25 µg/ml. Το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου αύξησε επίσης τα επίπεδα της TAC των κυττάρων EA.hy926 στα 25 και 50 µg/ml, ενώ η τελευταία συγκέντρωση μείωσε τα επίπεδα TBARS και CARBS σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Το εκχύλισμα από τον ερυθρο οίνο Αγιωργίτικο αύξησε επίσης τα επίπεδα της TAC στα EA.hy926 στα 50 µg/ml. Το εκχύλισμα από τον λευκο οίνο Ασύρτικο αύξησε σημαντικά τα επίπεδα TAC στα 12,5 µg/ml, ενώ τα επίπεδα TBARS και CARBS βρέθηκαν μειωμένα στη συγκέντρωση των 50 µg/ml. Τέλος, το εκχύλισμα του οίνου της Μαλαγουζιάς προκάλεσε μείωση των επιπέδων ROS στη συγκέντρωση 12,5 µg/ml και των επιπέδων TBARS στη συγκέντρωση 50 µg/ml. Τα αποτελέσματα με τις δράσεις των 4 εκχυλισμάτων οίνων στα επίπεδα των 5 βιοδεικτών (GSH, ROS, TAC, TBARS, P. CARBS) που αξιολογήθηκαν στην κυτταρική σειρά EA.hy926 παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 88: Οι επιδράσεις των εκχυλίσμάτων οίνου Ξινόμαυρο (Α), Αγιωργίτικο (Β), Ασύρτικο (Γ) και Μαλαγουζιά (Δ) στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής στην κυτταρική σειρά EA.hy926. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον έλεγχο ($p < 0,05$) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και σε τέσσερις ανεξάρτητες περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

5.3.2.3 Επίπεδα βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε κύτταρα MKN45

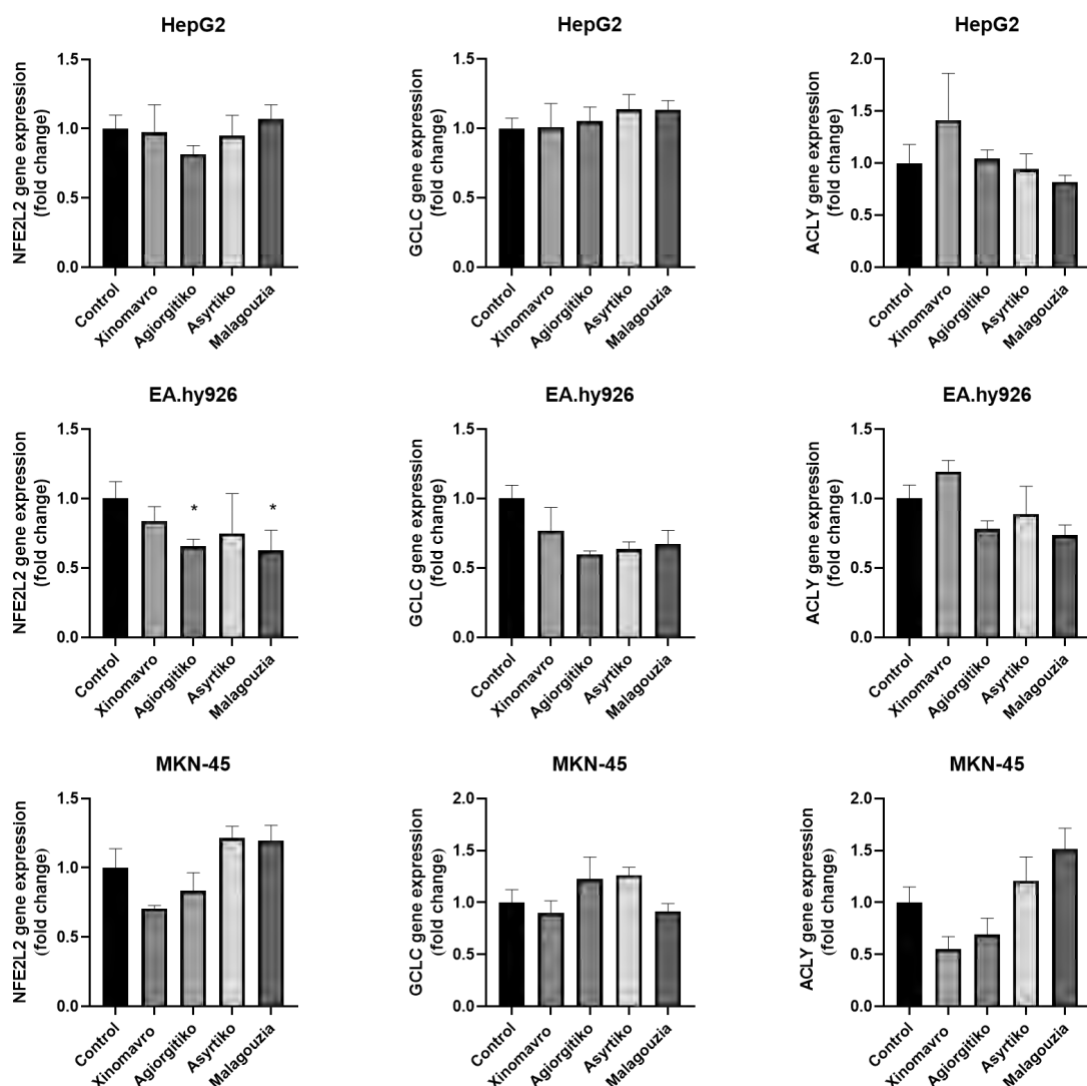
Το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου αύξησε τα επίπεδα της TAC στα 12,5 και 25 µg/ml, με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων TBARS και CARBS στις ίδιες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος του Αγιωργίτικου στα κύτταρα MKN45, τα επίπεδα GSH αυξήθηκαν σημαντικά στις συγκεντρώσεις 6,25 και 12,5 µg/ml, με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων ROS στα 12,5 και 25 µg/ml. Τα επίπεδα των CARBS βρέθηκαν μειωμένα μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος του Αγιωργίτικου στα 6,25 µg/ml. Στον αφορά τα εκχυλίσματα από τους λευκούς οίνους, τα εκχυλίσματα του Ασύρτικου και της Μαλαγουζιάς μείωσαν τα επίπεδα των ROS στις συγκεντρώσεις 6,25 και 25 µg/ml αντίστοιχα. Επιπλέον το εκχύλισμα του Ασύρτικου μείωσε τα επίπεδα των TBARS και των CARBS στα 25 µg/ml στα κύτταρα MKN45 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Τα αποτελέσματα με τις δράσεις των 4 εκχυλίσμάτων οίνων στα επίπεδα των 5 βιοδεικτών (GSH, ROS, TAC, TBARS, P. CARBS) που αξιολογήθηκαν στην κυτταρική σειρά MKN45 παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 89: Οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων οίνου Ξινόμαυρο (Α), Αγιωργίτικο (Β), Ασύρτικο (Γ) και Μαλαγουζιά (Δ) στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγής στην κυτταρική σειρά ΜΚΝ45. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον έλεγχο ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και σε τέσσερις ανεξάρτητες περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

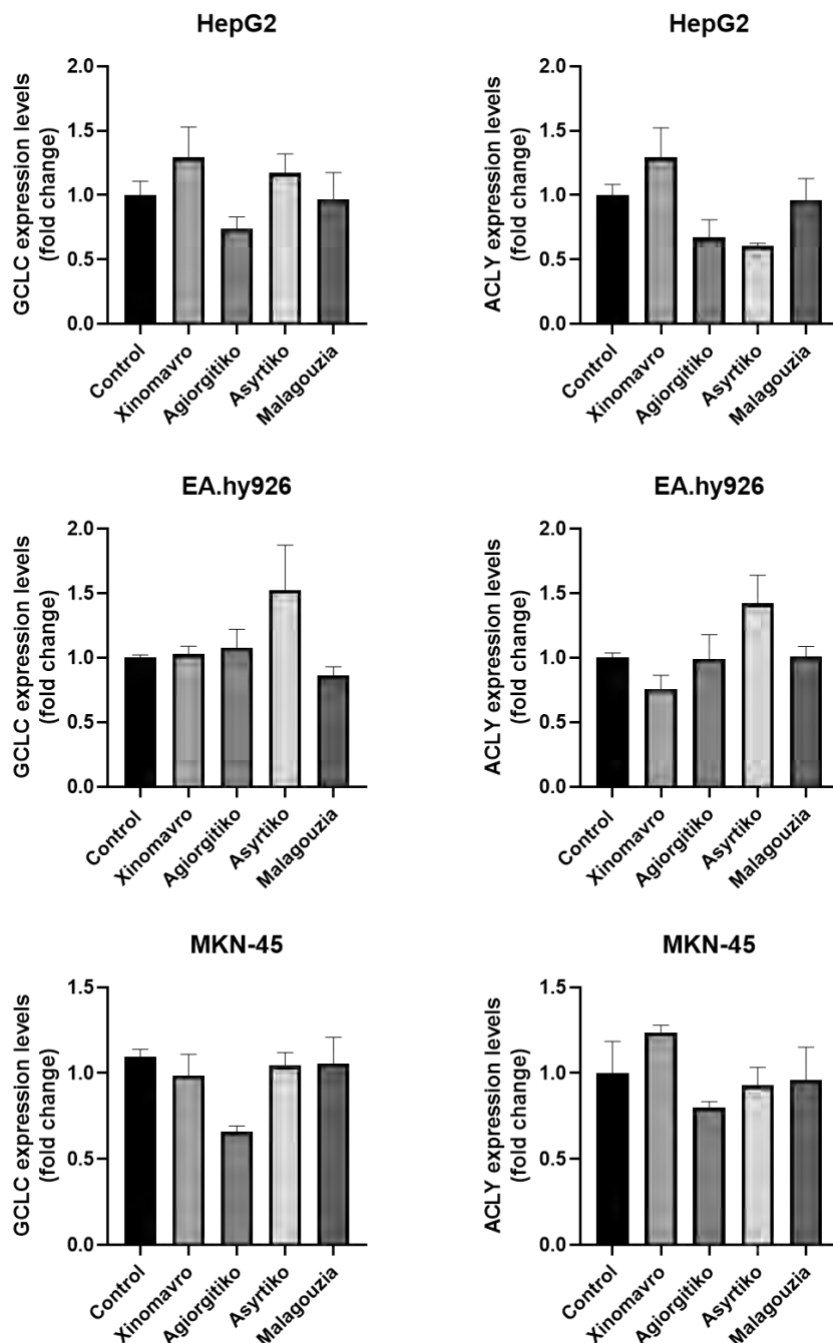
5.3.3 Έλεγχος έκφρασης γονιδίων και επιπέδων πρωτεϊνών

πως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα, τα τέσσερα εκχυλίσματα των οίνων δεν προκάλεσαν καμία στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων NFE2L2, GCLC και ACLY σε καμία από τις 3 εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα εκχυλίσματα από το Αγιωργίτικο και την Μαλαγουζιά, τα οποία προκάλεσαν μείωση της έκφρασης του γονιδίου NFE2L2 στα κύτταρα EA.hy926 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.



Εικόνα 90: Οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων οίνου Ξινόμαυρο (Α), Αγιωργίτικο (Β), Ασύρτικο (Γ) και Μαλαγουζιά (Δ) στην έκφραση των γονιδίων NFE2L2, GCLC και ACLY στις κυτταρικές σειρές HepG2, EA.hy926 και MKN45. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και σε τέσσερις ανεξάρτητες περιπτώσεις. Η γονιδιακή έκφραση έχει κανονικοποιηθεί με τη χρήση του γονιδίου αναφοράς *garpd* και της σύγκρισης με τα αντίστοιχα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου. Όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα χορηγήθηκαν σε δόση 50 $\mu\text{g/ml}$. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm \text{SEM}$.

Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών GCLC και ACLY δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από κανένα από τα τέσσερα εκχυλίσματα οίνου που χορηγήθηκαν στις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 91: Οι επιδράσεις των εκχυλίσμάτων οίνου Ξινόμαυρο (Α), Αγιωργίτικο (Β), Ασύρτικο (Γ) και Μαλαγουζιά (Δ) στα επίπεδα έκφρασης GCLC και ACLY στις κυτταρικές σειρές HepG2, EA.hy926 και MKN45. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον έλεγχο ($p < 0,05$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και σε τέσσερις ανεξάρτητες περιπτώσεις. Όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα χορηγήθηκαν σε δόση 50 $\mu\text{g/ml}$. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσοι όροι $\pm$ SEM.

5.4 Συζήτηση

Η μελέτη στο 3^ο επίπεδο αναλύσεων έδειξε ότι οι εμβληματικοί ελληνικοί οίνοι που προέρχονται από ερυθρές και λευκές ποικιλίες σταφυλιών Ξινόμαυρου, Αγιωργίτικου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς παρουσίασαν ισχυρή χημειοπροστατευτική δράση στις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές ενισχύοντας τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας και παρέχοντας προστασία έναντι οξειδωτικών τροποποιήσεων των βιολογικών, δομικών και λειτουργικών μακρομορίων τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εκχυλίσματα ερυθρών οίνων φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματικά από τα εκχυλίσματα λευκών οίνων, φαινόμενο που θα μπορούσε να αποδοθεί στην υψηλότερη περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες, όπως προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Folin-Ciocalteu στα επίπεδα αναλύσεων 1 και 2 σε αυτήν την διατριβή (Tekos et al., 2021).

Τα εκχυλίσματα οίνου είναι ιδιαίτερα πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις (Gutiérrez-Escobar et al., 2021), οι οποίες έχουν πολλούς ρόλους και δράσεις στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου και τη διατήρηση της οξειδωτικής του ομοιόστασης, άμυνας κ.α. καθιστώντας τις υποσχόμενες ενώσεις για θεραπευτικές εφαρμογές. Δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται ως σοβαρός μεσολαβητής στην παθογένεια διαφόρων παθοφυσιολογικών καταστάσεων, η αξιολόγηση των βιολογικών δραστηριοτήτων των φυτοχημικών εκχυλισμάτων που είναι πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις μπορεί να αποτελέσει κρίσιμο παράγοντα για τον εντοπισμό πιθανών χημειοπροφυλακτικών ουσιών και μειγμάτων με συνεργιστική δράση. Ως εκ τούτου, τα φυσικά, φυτικά εκχυλίσματα που ενισχύουν τα συστήματα αντιοξειδωτικής άμυνας και απομακρύνουν τα οξειδωμένα προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού θα μπορούσαν να είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία. Παρ' όλα αυτά, μέχρι σήμερα, οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι παράγοντες αυτοί ασκούν τις προληπτικές τους επιδράσεις κατά των ασθενειών, παραμένουν άγνωστοι.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκαν οι βιολογικές δράσεις των εκχυλισμάτων ερυθρού και λευκού οίνου στις κυτταρικές σειρές HepG2, EA.hy926 και MKN45. Με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων επιπέδων επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι οι ελληνικές ποικιλίες Ξινόμαυρου, Αγιωργίτικου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική, αναγωγική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση σε όλες τις δοκιμές που υποβλήθηκαν (Tekos et al., 2021). Ωστόσο, απαιτούνται

περαιτέρω μελέτες σε συστήματα βασισμένα σε κυτταρικές σειρές αλλά και *in vivo* πειράματα ώστε να προσδιοριστεί εάν οι δράσεις που φάνηκαν σε *in vitro* επίπεδο μπορούν περάσουν σε κυτταρικό επίπεδο και στην συνέχεια σε ζωικά μοντέλα που προσομοιάζουν περισσότερο τις συνθήκες στον άνθρωπο. Ως εκ τούτου, στο παρόν κεφάλαιο, αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις της χορήγησης των εκχυλισμάτων οίνου στην κυτταρική βιωσιμότητα και σε μια σειρά οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών, δηλαδή στα επίπεδα GSH, ROS, TAC, TBARS και CARBS, προκειμένου να δημιουργηθεί ένα σύστημα βιοδεικτών *in vitro* με βάση τα αποτελέσματα σε ανθρώπινα κύτταρα. Αυτό το σύστημα βιοδεικτών ενσωματώνει τυποποιημένα μεθοδολογικά μοντέλα για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών δράσεων των εκχυλισμάτων οίνου, που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην κατανόηση των πιθανών χρήσεων τους ως βοηθητικών μειγμάτων, σε προσπάθειες ενίσχυσης της κυτταρικής υγείας είτε με την υπεύθυνη κατανάλωση του οίνου είτε με την δημιουργία βιολειτουργικών σκευασμάτων με εκχυλίσματα οίνων.

στον αφορά τις δοκιμές που διεξήχθησαν στις 3 κυτταρικές σειρές, προέκυψαν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα και στους 5 βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν. Τα κύτταρα HepG2 που προέρχονται από ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα, είναι μια καθιερωμένη κυτταρική σειρά σε εργαστήρια σε όλο τον κόσμο με καλά διατηρημένη μορφολογία και λειτουργία, ανθεκτική και εύκολα καλλιιεργήσιμη (Alía et al., 2006). Τα κύτταρα της σειράς αυτής χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διερεύνηση του μεταβολισμού του ήπατος, της ηπατοκαρκινογένεσης, καθώς και για μελέτες διατροφής και στόχευσης φαρμάκων (Mersch-Sundermann et al., 2004). Πιο συγκεκριμένα μετά την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής από το έντερο, αυτά βιομετασχηματίζονται στο ήπαρ και αυτός είναι ο λόγος που τα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιούνται συνήθως σε διατροφικές μελέτες (Maciej Serda et al., 2012). Τα υβριδικά ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 χρησιμοποιούνται συνήθως για ερευνητικούς σκοπούς σχετικά με τις καρδιαγγειακές παθήσεις ενώ παρουσιάζουν επίσης σταθερότητα και ευκολία στην καλλιέργεια τους (Ahn et al., 1995). Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν σταθερά ενδοθηλιακά χαρακτηριστικά και διατηρούν όλες τις λειτουργικές και δομικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων σε οξειδοαναγωγικά ερεθίσματα. Τέλος, το γαστρεντερικό σύστημα αποτελεί επίσης σημαντικό κομμάτι της διαδρομής του οίνου και των εκχυλισμάτων στον οργανισμό και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν και τα ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα MKN45.

Προηγούμενες επιστημονικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη φαρμάκων με βάση δοκιμές *in vitro*, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις αξιολογούν την αναστολή της ανάπτυξης ή την πρόκληση θανάτου των καρκινικών κυττάρων (Ferruelo et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, ο κύριος μηχανισμός που διερευνήθηκε σε αυτές τις μελέτες είναι η απόπτωση. Αντίθετα, η καινοτομία της παρούσας μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι αξιολογεί τις επιδράσεις μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων οίνου που προέρχονται από τις εμβληματικές ελληνικές ποικιλίες Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά στις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές. Εξετάζει τις οξειδοαναγωγικές μεταβολές και τις μεταβολές στα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών που κωδικοποιούν κρίσιμα αντιοξειδωτικά γονίδια και γονίδια που ενεργοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία αποτοξικοποίησης ενός οργανισμού. Τα κύτταρα HepG2 επηρεάστηκαν από τη χορήγηση μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων οίνου, όπως υποδεικνύεται από τις μεταβολές στα επίπεδα συγκεκριμένων βιοδεικτών οξειδοαναγωγής. Αξίζει να αναφερθεί ότι η χορήγηση του Ξινόμαυρου εκχυλίσματος οίνου παρουσίασε τα πιο σημαντικά αποτελέσματα, τα οποία υποστηρίζονται από την αύξηση των επιπέδων TAC και τη μείωση των επιπέδων ROS, TBARS και CARBS. Το εκχύλισμα του Αγιωργίτικου οίνου ενεργοποίησε την αντιοξειδωτική άμυνα, που εκφράστηκε μέσω της αύξησης των επιπέδων TAC, ενώ τα εκχυλίσματα από τις ποικιλίες Ασύρτικο και Μαλαγουζιά απέτρεψαν την πρόκληση σοβαρής οξειδωτικής βλάβης, που αποδεικνύεται από τη μείωση των επιπέδων TBARS και CARBS. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε επίσης στα κύτταρα EA.hy926 και MKN45 μετά τη χορήγηση μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των 4 εξεταζόμενων εκχυλισμάτων οίνου, όπως υποδεικνύεται από την ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας. Παρόλα αυτά, οι αντίστοιχες οξειδοαναγωγικές μεταβολές στα κύτταρα EA.hy926 μετά τη χορήγηση των εκχυλισμάτων των λευκών οίνων Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς, ανιχνεύθηκαν σε υποπολλαπλάσιες συγκεντρώσεις, περίπου οκτώ φορές χαμηλότερες, σε σύγκριση με τα κύτταρα HepG2. Τέλος, η χορήγηση όλων των εκχυλισμάτων οίνου προκάλεσε οξειδοαναγωγικές μεταβολές στα κύτταρα MKN45 παρόμοιες με τις άλλες 2 κυτταρικές σειρές χωρίς κάτι να διαφοροποιείται σημαντικά.

Ο τρόπος δράσης μεταξύ των εκχυλισμάτων οίνου Ξινόμαυρου, Αγιωργίτικου, Ασύρτικου και Μαλαγουζιάς είναι εμφανής σε όλες τις κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκαν. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα του Αγιωργίτικου οίνου ενεργοποίησε

τους κυτταρικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στα κύτταρα HepG2 και EA.hy926, ενώ στα MKN45 προκάλεσε την ενίσχυση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού με αποτέλεσμα την μείωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, ενώ παράλληλα προστάτευσε από τις οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών. Αντίθετα, το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου βελτίωσε την κυτταρική αντιοξειδωτική ισορροπία, ενώ μείωσε και τα υποπροϊόντα της οξείδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων σε όλες τις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τους λευκούς οίνους Ασύρτικο και Μαλαγουζιά απέτρεψαν κυρίως την οξειδωτική βλάβη σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενώ το εκχύλισμα του Ασύρτικου οίνου αύξησε τα επίπεδα TAC στις κυτταρικές σειρές EA.hy926 και MKN45. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα ερυθρού οίνου και οι πολυφαινόλες που περιέχουν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι του Nrf2 αλλά και να ρυθμίσουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Banc et al., 2022; Martínez-Huélamo et al., 2017; Qader et al., 2020). Στον αφορά τα εκχυλίσματα που προήλθαν από τους λευκού οίνους, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την ικανότητά τους να μειώνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων στο αίμα αρουραίων (Banc et al., 2022). Ωστόσο δεν υπάρχει διαθέσιμη επιστημονική βιβλιογραφία που να υποδεικνύει την επαγωγή του συστήματος Nrf2.

Τα επίπεδα των ROS των καρκινικών κυττάρων είναι καλά μελετημένα και φαίνεται να διαφοροποιούνται σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Panieri & Santoro, 2016). Πιο συγκεκριμένα τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από οξειδοαναγωγική διαταραχή που προκαλεί αύξηση των επιπέδων των ROS σε σύγκριση με τα φυσιολογικά επίπεδα ROS των κυττάρων (Nakamura & Takada, 2021). Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει, στις περισσότερες περιπτώσεις, την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (Nakamura & Takada, 2021). Στο πλαίσιο αυτό, τα χαμηλά έως μεσαία επίπεδα ROS μπορούν να οδηγήσουν σε γενετική αστάθεια και θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση της πρώτης γραμμής ομοιοστατικών αποκρίσεων έναντι διαφόρων ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγική ισορροπία. Ο Nrf2 έχει την δυνατότητα να καταστείλει την καρκινογένεση, ιδίως στα πρώτα της στάδια, μέσω της μείωσης των επιπέδων των ROS (Sajadimajd & Khazaei, 2018). Ως εκ τούτου, όλοι οι παράγοντες που ενεργοποιούν τον Nrf2 αποτελούν καλή πηγή για την δημιουργία

φαρμάκων που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση χρόνιων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Ma, 2013; Robledinos-Antón et al., 2019; Sajadimajd & Khazaei, 2018). Η συμβατική φαρμακευτική χημειοθεραπεία μπορεί να συνδυαστεί με τέτοιους παράγοντες και εκχυλίσματα για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας εντός του θεραπευτικού παραθύρου. Διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις, όπως η ρεσβερατρόλη και η κερκετίνη (Farkhondeh et al., 2020), με την τελευταία να περιέχεται σε όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και τη ρεσβερατρόλη να ανιχνεύεται σε μικρές ποσότητες μόνο στο εκχύλισμα του οίνου της Μαλαγουζιάς, μπορούν να ενεργοποιήσουν τον Nrf2, αλλά και να δράσουν απευθείας εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες (Hashemzaei et al., 2020). Ο μηχανισμός δράσης που αναφέρεται για την ενεργοποίηση του Nrf2 από τις περισσότερες από αυτές τις ουσίες και τα μείγματα, είναι μέσω της τροποποίησης των διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ δύο μορίων Keap1 και συγκεκριμένα των Cys273 και Cys288, με αποτέλεσμα να αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση του Keap1, που απελευθερώνει τον Nrf2 και αυτός μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας των ARE προκαλώντας την έκφραση αντιοξειδωτικών μορίων (Wakabayashi et al., 2004). Το σύνολο των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και συγκεκριμένα στο 3^ο επίπεδο αναλύσεων αποτελεί την πρώτη μελέτη τέτοιου είδους, που μελετά τη συνδυασμένη χημειοπροφυλακτική δράση ενός συνόλου ουσιών που δημιουργούν ένα μείγμα που προέρχεται από τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα των 4 ποικιλιών οίνων.

Ωστόσο, παρά τα αυξημένα επίπεδα των αντιοξειδωτικών (GSH, TAC), της μείωσης των ROS, και της μείωσης της λιπιδικής και πρωτεϊνικής καταστροφής, η γονιδιακή έκφραση και τα πρωτεϊνικά επίπεδα του NFE2L2 βρέθηκαν μειωμένα στην παρούσα μελέτη μετά τη χορήγηση των εκχυλισμάτων του Αγιωργίτικου και Μαλαγουζιάς στην κυτταρική σειρά EA.hy926. Ο Nrf2 μπορεί να ρυθμίζει τα επίπεδα της GSH, της κύριας μη πρωτεϊνικής θειόλης των κυττάρων των θηλαστικών, παίζοντας κρίσιμο ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, στην αντιοξειδωτική άμυνα και στην προστασία από την τοξικότητα των ηλεκτρόφιλων ξενοβιοτικών, όλες τους σημαντικές λειτουργίες που καθορίζουν την τύχη των κυττάρων (Forman et al., 2009). Επιπλέον, ο Nrf2 έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει τα επίπεδα της GSH μέσω της GCLC, η οποία έχει διερευνηθεί για την αλληλεπίδραση που έχει με την κατανάλωση οίνου τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνών (Nunes et al., 2016), αποκαλύπτοντας

στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα, προηγούμενες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι ένα εκχύλισμα πορτογαλικού ερυθρού οίνου από την περιοχή Douro, μπορεί να αυξήσει τα πυρηνικά επίπεδα του Nrf2, ενεργοποιώντας το μονοπάτι Nrf2, οδηγώντας όχι μόνο σε μια ρύθμιση της έκφρασης της οξυγενάσης της αίμης-1 (HO-1), αλλά και σε μια αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της γλουταμινικής-κυστεϊνικής λιγάσης (GCLC), ενισχύοντας έτσι τη σύνθεση της GSH. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι ένα εκχύλισμα ιταλικού ερυθρού οίνου (*Vitis Vitae*, Revino Italia, Corte Ferrazzette, S. Martino B.A., Verona, Italy) αύξησε τα πυρηνικά επίπεδα Nrf2 και την έκφραση των γονιδίων HO-1 και GCLC στην κυτταρική σειρά THP-1 που μοιάζει με μακροφάγο (Stranieri et al., 2022). Η διατήρηση της ομοιόστασης της οξειδοαναγωγής μέσω της διαμόρφωσης αυτών των ενζύμων και γονιδίων, συνδέεται στενά με τον ενεργειακό μεταβολισμό (Damiano et al., 2020). Ο ενεργειακός μεταβολισμός αποτελεί πηγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) που με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη ροή μεταβολικών μονοπατιών (Kang et al., 2015).

Επιπλέον, για τη διασφάλιση της ομοιόστασης της οξειδοαναγωγής, τα μεταβολικά μονοπάτια και τα αντιοξειδωτικά συστήματα συχνά έχουν όμοιους μηχανισμούς ρύθμισης και τα επίπεδα ή η κατάσταση του ενός επηρεάζει άμεσα την απόκριση του άλλου. Οι μεταβολικές οδοί παραγωγής ενέργειας των ευκαρυωτικών κυττάρων περιλαμβάνουν βασικά την αερόβια γλυκόλυση, τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και τη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Η τελευταία είναι υπεύθυνη για την παροχή του ακετυλο-συνενζύμου Α στον κύκλο του κιτρικού οξέος ((Dominguez et al., 2021). Ένα από τα κύρια ένζυμα που καταλύουν τον σχηματισμό του κυτταρικού ακετυλο-συνενζύμου Α είναι η ACLY (Dominguez et al., 2021; Kang et al., 2015). Εκτός από την τυπική της λειτουργία στην παροχή ακετυλο-CoA για τη *de novo* λιπογένεση, η ACLY συμβάλλει στην επιγενετική ρύθμιση μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών και στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω του ελέγχου του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων (Dominguez et al., 2021). Στην παρούσα έρευνα, η έκφραση του γονιδίου και το επίπεδο πρωτεΐνης ACLY δεν επηρεάστηκαν μετά τη χορήγηση εκχυλισμάτων οίνου. Αντίθετα, ένα εκχύλισμα ερυθρού οίνου *Vitis vinifera* L. από την Ιταλία, βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα πρωτεΐνης NF-κΒ, τη δραστηριότητα του υποκινητή και την πυρηνική μετατόπιση,

καθώς και να μειώνει τα επίπεδα του μεταβολικού γονιδίου και της πρωτεΐνης της ACLY (Santarsiero et al., 2021).

Ένα σημαντικό εύρημα αυτής της ερευνητικής μελέτης είναι ότι το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου ενεργοποίησε τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς, εξάλειψε την περίσσεια των ελεύθερων ριζών και προστάτευσε τις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές από την οξειδωτική βλάβη, γεγονός που υποδηλώνει τον πολλά υποσχόμενο ρόλο του ως ισχυρό χημειοπροφυλακτικό παράγοντα. Η ισχυρή βιοδραστικότητα που παρουσιάζει ενδέχεται να σχετίζεται με την υψηλή πολυφαινολική του περιεκτικότητα καθώς και το αντιοξειδωτικό και αντιμεταλλαξιγόνο δυναμικό του, όπως περιγράφηκε στο 1^ο και 2^ο επίπεδο αναλύσεων (Tekos et al., 2021). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με επιστημονικά ευρήματα από την βιβλιογραφία η οποία προτείνει ότι οι πολυφαινολικές ενώσεις, όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το καφταρικό και το κουταρικό οξύ, που ανιχνεύθηκαν στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα (Tekos et al., 2021), ασκούν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* (Warleta et al., 2011). Επομένως, η μεγάλη βιοδραστικότητα του εκχυλίσματος του Ξινόμαυρου οίνου μπορεί να αποδοθεί στο σύνθετο μείγμα βιοδραστικών φυτοχημικών ουσιών που περιέχει. Οι ενώσεις αυτές, ενδέχεται να παρουσιάζουν δράση τόσο αυτόνομα όσο και συνεργιστικά μεταξύ τους, είτε απευθείας εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες, είτε με την έκφραση κρίσιμων γονιδίων (Mitra et al., 2022).

Με τον τρόπο αυτό το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου μπορεί να παρουσιάζει μεγαλύτερη δράση σε σύγκριση με μεμονομένα συστατικά ή δραστικές ουσίες και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές, από τη φαρμακευτική και τα συμπληρώματα διατροφής, τα πρόσθετα τροφών και τα βιολειτουργικά τρόφιμα μέχρι πρόσθετα ζωοτροφών. Παρ' όλα αυτά, η εφαρμογή φυσικών ουσιών ως βοηθητικών ουσιών για αποτελεσματικότερη θεραπεία, θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτική, καθώς οι επιδράσεις τους είναι αμφιλεγόμενες και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από διάφορες παραμέτρους, μεταξύ των οποίων η δόση χορήγησης, ο τύπος του κυττάρου, η διάρκεια της έκθεσης και άλλες εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Aliyev et al., 2021; Fitzgerald et al., 2015; Gasmi et al., 2022; Guzzo et al., 2014; Lamb et al., 2015; L. Li et al., 2019; Sasaki et al., 2008; Stepanic et al., 2015; Wiggers et al., 2022; C. Zhang et al., 2015). Οι προαναφερθέντες παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα αυτών των φυσικών προϊόντων και ενδέχεται να προκαλέσουν,

σε χαμηλές δόσεις, κυτταρικές προσαρμοστικές αποκρίσεις, παρέχοντας μη γραμμικούς τρόπους δράσης στο εκτεθειμένο κυτταρικό σύστημα (E. J. Calabrese, 2018; E. J. Calabrese et al., 2016, 2020; V. Calabrese et al., 2008, 2010; Skaperda, Tekos, Vardakas, et al., 2021). Οι αποκρίσεις αυτές περιλαμβάνουν σημαντικά βιολογικά χαρακτηριστικά που έχουν αποκτήσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον, ένα φαινόμενο που συνήθως αναφέρεται ως «όρμηση» (V. Calabrese et al., 2010). Ενδείξεις τέτοιων φαινομένων παρατηρούνται και ως απόκριση στη χορήγηση των εκχυλισμάτων των 4 ποικιλιών που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, αποκαλύπτοντας τη σημασία της καλύτερης κατανόησης των φαινομένων της όρμησης που θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για παρεμβάσεις αντιμετώπισης ή/και πρόληψης ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και την διαταραχή της κυτταρικής σηματοδότησης.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα από τα εκχυλίσματα ερυθρού και λευκού οίνου προκύπτει ότι έχουν άμεσες επιδράσεις στην οξειδοαναγωγική κατάσταση τριών διαφορετικών τύπων κυττάρων και συγκεκριμένα των HepG2, EA.hy926 και MKN45. Τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να αναδείξουν έναν πιθανό ρόλο των συστατικών του ερυθρού και του λευκού οίνου στον οξειδοαναγωγικό μεταβολισμό των συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων. Επειδή ο οίνος είναι ένα φυσικό προϊόν που ούτως ή άλλως καταναλώνεται στην καθημερινή ζωή, από δισεκατομμύρια ανθρώπους, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για το σχεδιασμό μιας πιο αποτελεσματικής επικουρικής θεραπείας ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων.

Ο περιορισμός της μελέτης είναι το γεγονός ότι τα περισσότερα από αυτά τα εκχυλίσματα αντιδρούν με κατάλοιπα κυστεΐνης διαφορετικών μορίων και επομένως δεν υπάρχει μοριακή εξειδίκευση καθώς επίσης και η παρατήρηση τοξικών επιδράσεων εκτός του στόχου κυρίως σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Τέλος, σημαντικά μειονεκτήματα της χορήγησης φυσικών εκχυλισμάτων είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και διαπερατότητά τους διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Λαμβάνοντας υπόψη όλες αυτές τις παραμέτρους, είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα σε *in vivo* επίπεδο, ώστε να διερευνηθεί στη συνέχεια η δράση των εκχυλισμάτων σε όλους τους ιστούς και τα όργανα σε επίπεδο πειραματόζωων. Αυτός ο πειραματικός σχεδιασμός θα μπορούσε να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με συγκεκριμένες οδούς και τρόπους δράσης μετά τη χορήγηση

εκχυλισμάτων οίνου και να δημιουργήσει το προφίλ ενός φυσικού εκχυλίσματος πλούσιου σε αντιοξειδωτικές, βιοδραστικές ενώσεις που συμμετέχουν ευεργετικά στην ανθρώπινη υγεία.

Εν κατακλείδι, οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο 3^ο αυτό επίπεδο, συμπληρώνουν τα προηγούμενα αποτελέσματα και ισχυροποιούν τις ελληνικές ποικιλίες Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά καθώς δημιουργείται σταδιακά ένας ολόενα και μεγαλύτερος φάκελος με τα σημαντικά επιστημονικά δεδομένα που προστίθενται από την παρούσα μελέτη, σχηματίζοντας για πρώτη φορά την επιστημονική ταυτότητα των 4 αυτών ποικιλιών οίνου. Η ταυτότητα αυτή αυξάνει την προστιθέμενη αξία των προϊόντων αυτών ενώ ανοίγει παράλληλα νέες αγορές με νέες εφαρμογές, όπως τη φαρμακοβιομηχανία, τη βιομηχανία καλλυντικών, τη βιομηχανία τροφίμων και τέλος τη βιομηχανία ζωοτροφών όπου μέχρι σήμερα είναι ουσιαστικά ανεκμετάλλευτες.

6 4^ο Επίπεδο αναλύσεων. *In vivo* χορήγηση εκχυλίσματος Ξινόμαυρου οίνου.

6.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός του 4^{ου} επιπέδου αναλύσεων είχε ως στόχο τον έλεγχο της επίδρασης του πιο δραστικού εκχυλίσματος που προέκυψε από τα προηγούμενα επίπεδα αναλύσεων σε πειραματόζωα, ώστε οι συνθήκες και τα βιολογικά συστήματα να προσομοιάζουν περισσότερο στον ανθρώπινο οργανισμό.

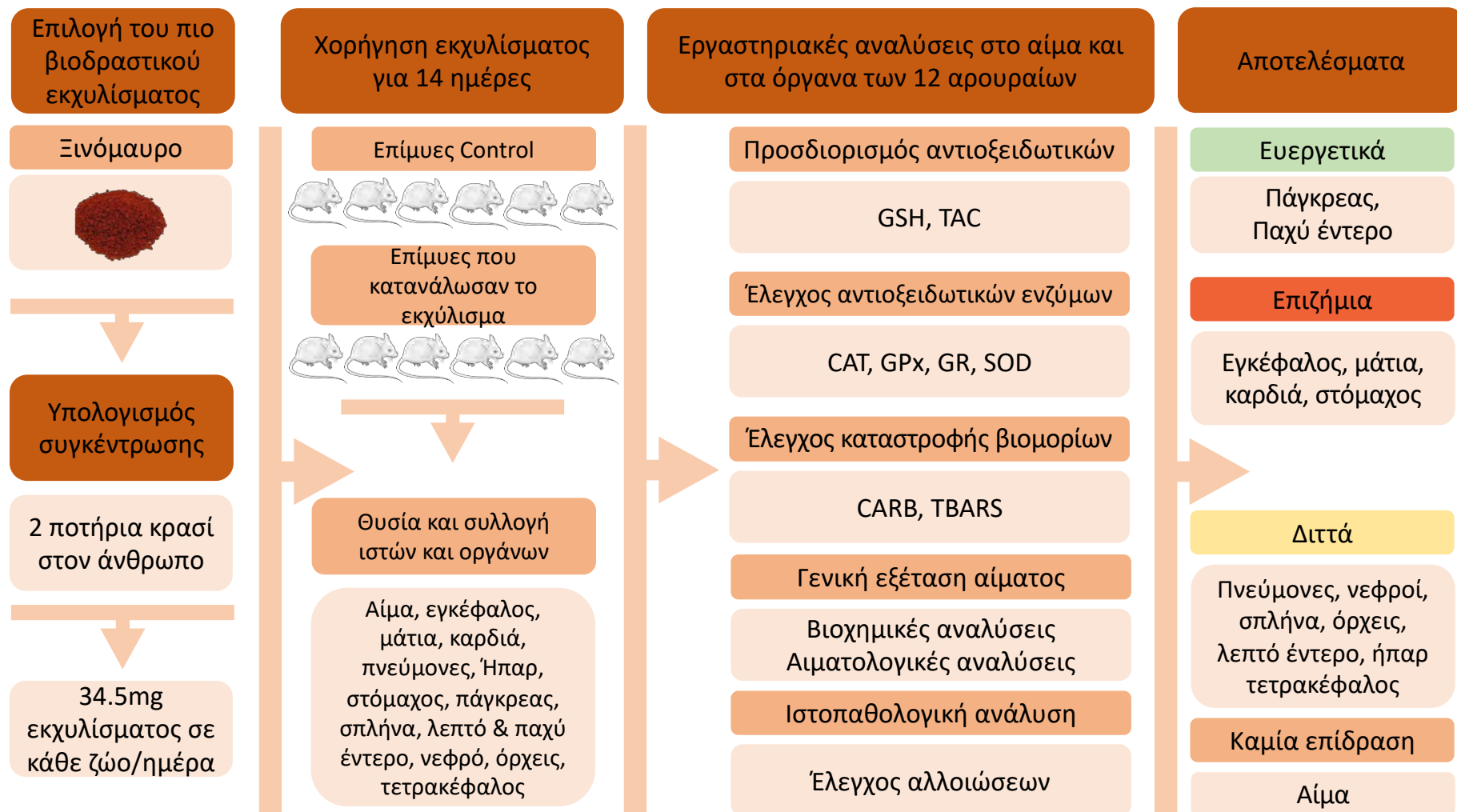
Το εκχύλισμα που επιλέχθηκε ήταν αυτό που προέκυψε από την ποικιλία οίνου Ξινόμαυρο και χορηγήθηκε σε 6 αρσενικούς επίμυες φυλής Wistar, ενώ άλλοι 6 αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και είχαν την ίδια ακριβώς διαχείριση και συνθήκες τροφής, νερού και κύκλου μέρας νύχτας (12 ώρες μέρα, 12 ώρες νύχτα).

Το εκχύλισμα χορηγούνταν με το νερό που είχαν διαθέσιμο οι επίμυες ενώ η ποσότητα που κατανάλωσαν για 14 ημέρες ήταν ανάλογη της ημερήσιας δόσης που αντιστοιχούσε σε κατανάλωση 2 ποτηριών (125 ml) οίνου από τον άνθρωπο.

Συνολικά από τα πειραματόζωα συλλέχθηκαν 14 ιστοί και αίμα. Συγκεκριμένα, σε ξηρό πάγο συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε το αίμα από τους 12 επίμυες και σε υγρό άζωτο διατηρήθηκαν δείγματα από τους 14 ιστούς τους: εγκέφαλος, μάτια, καρδιά, πνεύμονες, ήπαρ, στόμαχος, πάγκρεας, σπλήνας, λεπτό & παχύ έντερο, νεφρό, όρχεις και τετρακέφαλος. Τμήματα των παραπάνω οργάνων διαχωρίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασέτες με παραφίνη.

Σε όλα τα δείγματα έγινε προσδιορισμός αντιοξειδωτικών (GSH και TAC), έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας (CAT, GPx, GR, SOD), έλεγχος οξειδωτικής βλάβης βιομορίων (CARB, TBARS), γενική εξέταση αίματος (Βιοχημικές και αιματολογικές) και τέλος ιστοπαθολογική ανάλυση.

Η γραφική απεικόνιση του 4^{ου} επιπέδου αναλύσεων παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 92: Γραφική απεικόνιση 4^{ου} Επιπέδου αναλύσεων. Εδώ αναφέρεται αποτελέσματα ενώ είσαι στη μεθοδολογία. Δεν είναι σωστό.

6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Δόση χορήγησης

Η δόση που χορηγήθηκε στους επίμυες ήταν ανάλογη της κατανάλωσης 2 ποτηριών οίνου των 125 ml από τον άνθρωπο και επομένως καθορίστηκε σε 25mg πολυφαινόλων ανά κιλό σωματικού βάρους. Το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου που χρησιμοποιήθηκε είχε 26,7% πολυφαινόλες, επομένως χρειάστηκαν 34,5 mg από το εκχύλισμα για κάθε επίμυ ανά ημέρα. Ο υπολογισμός των δόσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέση τιμή του σωματικού βάρους των επίμυων την πρώτη ημέρα του πειραματισμού.

Οι δόσεις παρασκευάστηκαν με την διάλυση του εκχυλίσματος των 34,5 mg σε 1,5ml ddH₂O. Το διάλυμα αυτό χορηγούνταν καθημερινά στο πόσιμο νερό που είχαν διαθέσιμο για κατανάλωση οι επίμυες. Στην ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δόσεις με 1,5 ml ddH₂O στο οποίο δεν είχε προστεθεί το προς εξέταση εκχύλισμα.

6.2.2 Επιλογή του συγκεκριμένου είδους ζώου

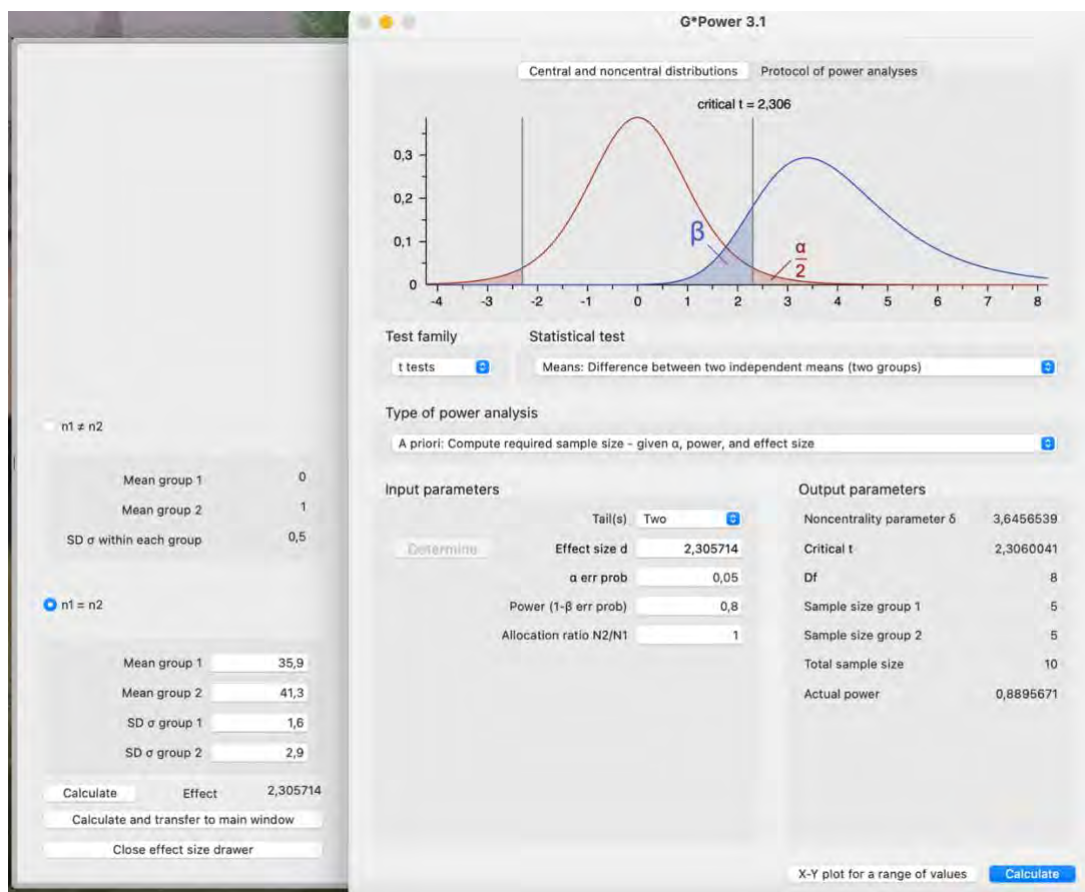
Στην παρούσα διατριβή η επιλογή του επίμυος ως πειραματόζωου έγινε διότι έχει διαπιστωθεί ότι τα γονίδιά του σε ποσοστό 90% εμφανίζουν ομοιότητα αλληλουχίας με αυτά του ανθρώπου. Για το λόγο αυτό ο επίμυς είναι ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα πειραματικά είδη στις βιολογικές επιστήμες. Ο επίμυς αποτελεί αξιόπιστο μοντέλο για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες δεδομένου ότι αντανakλά ικανοποιητικά τα φυσιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του ανθρώπου. Επίσης, ο επίμυς είναι ένα εύχρηστο ζώο εργαστηρίου με σχετικά μικρό κόστος διατροφής και συντήρησης. Επιπλέον, η ύπαρξη αποτελεσμάτων προηγούμενων πειραματικών εργασιών σε επίμυες, στις οποίες εξετάστηκε το οξειδωτικό στρες, θα εξασφάλιζε την αξιόπιστη σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας. Επιλέχθηκε η χρήση μόνο αρρένων επίμυων για να αποκλεισθεί η πιθανή επίδραση του φύλου στις μετρούμενες (εξαρτημένες) μεταβλητές.

6.2.3 Συνολικός αριθμός ζώων που θα χρησιμοποιηθούν – τεκμηρίωση βάσει στατιστικής ανάλυσης

Η εκτίμηση του μεγέθους του δείγματος πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό G*Power 3 (Version 3.1.9.6 for Mac). Κριτήριο ήταν το ελάχιστο μέγεθος δείγματος για να επιτευχθεί ικανοποιητική στατιστική ισχύς τουλάχιστον 80% για τη μέθοδο προσδιορισμού των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η οποία αποτελεί βασική παράμετρο για το πειραματικό μας πρωτόκολλο. Συμπληρωματικά, η γλουταθειόνη αποτελεί το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο του οργανισμού και η εκτίμησή της, αποτελεί σημαντικό δείκτη σχετικά με την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού. Για τον υπολογισμό του effect size, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα (μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις) από πιλοτική έρευνα του εργαστηρίου μας με επίμυες. Προκειμένου να υπολογιστεί το συνολικό μέγεθος δείγματος με τον ελάχιστο δυνατό αριθμό ζώων, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις του μέσου όρου των μέσων τιμών της ομάδας που έλαβε πολυφαινόλες (ομάδα πολυφαινολών), συγκριτικά με την ομάδα που δεν έλαβε (ομάδα Ελέγχου) εφαρμόζοντας, μέσω του G*Power 3, τη στατιστική ανάλυση t-test: MEANS, differences between two independent means (two groups). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α ορίστηκε στο 0,05. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι για την ικανοποίηση των παραπάνω κριτηρίων για 2 ομάδες ο απαιτούμενος συνολικός αριθμός πειραματόζων είναι 10 (5 ανά ομάδα).

Για την περίπτωση θανάτου κάποιου από τα ζώα τόσο της ομάδας ελέγχου όσο και της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα, προστέθηκε ένα επιπλέον ζώο σε κάθε ομάδα με τον συνολικό αριθμό να είναι τελικά 12.

Ακολουθεί το G*power Output, όπου φαίνεται το πρωτόκολλο για την ανάλυση ισχύος και ο υπολογισμός του συνολικού μεγέθους του δείγματος:

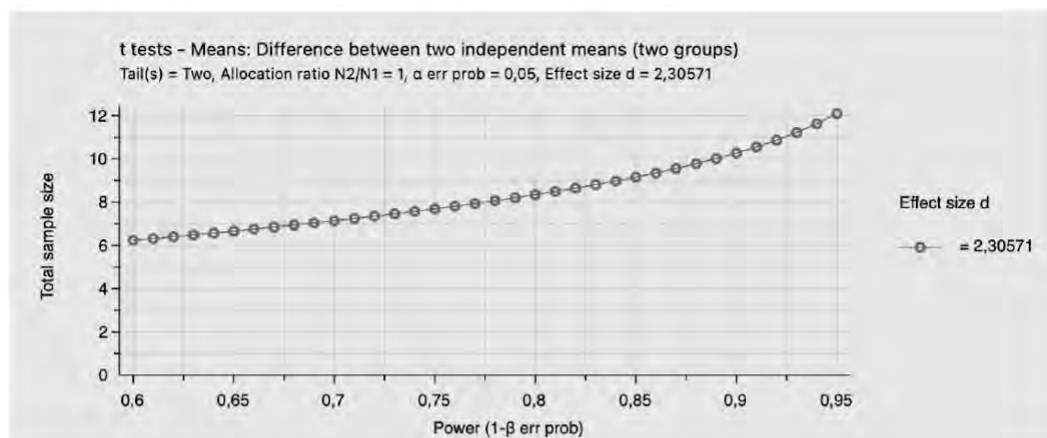


Εικόνα 93: G*power Output.

Παρατίθενται και τα νούμερα που προέκυψαν από την πιλοτική μελέτη:

Πίνακας 30: Νούμερα που προέκυψαν από την πιλοτική μελέτη για το G*power. Σωστά, το είχα γράψει παραπάνω ως σχόλιο αλλά το έσθησα.

GSH ομάδα Ελέγχου (μmol GSH/g protein)	GSH ομάδα Πολυφαινολών (μmol GSH/g protein)
34.2	38.3
37.4	41.4
36.1	44.1



[1] -- Tuesday, January 26, 2021 -- 11:36:43

t tests - Means: Difference between two independent means (two groups)

```

Analysis:  A priori: Compute required sample size
Input:     Tail(s)                = Two
           Effect size d          = 2,305714
           α err prob             = 0,05
           Power (1-β err prob)   = 0,8
           Allocation ratio N2/N1 = 1
Output:    Noncentrality parameter δ = 3,6456539
           Critical t              = 2,3060041
           Df                      = 8
           Sample size group 1     = 5
           Sample size group 2     = 5
           Total sample size       = 10
           Actual power            = 0,8895671
    
```

Εικόνα 94: G*power Output, t-test.

6.2.4 Αναγκαιότητα για χρησιμοποίηση ζώων αντί άλλης εναλλακτικής μεθόδου πειραματισμού που δεν χρησιμοποιεί ζώα

Στόχος της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας ήταν η εύρεση της επίδρασης και του μηχανισμού δράσης ενός εκχυλίσματος οίνου πλούσιου σε πολυφαινόλες ως προς την οξειδοαναγωγική κατάσταση σε διάφορους ιστούς. Έτσι γίνεται κατανοητό πως η μελέτη σε κυτταρικές σειρές που έχει ήδη πραγματοποιηθεί δεν μπορεί να αντικαταστήσει τη συνολική επίδραση σε ολόκληρο τον οργανισμό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση θα ληφθεί υπόψη τόσο η απορρόφηση του εκχυλίσματος οίνου από το γαστρεντερικό όσο και ο μεταβολισμός στους επιμέρους ιστούς που θα εξεταστούν και έτσι θα καταλήξουμε σε μια ολοκληρωμένη εικόνα της δράσης του, κάτι που δεν είναι εφικτό σε τέτοιο βαθμό μόνο με τις κυτταρικές σειρές. Ακόμα, δεν

βρέθηκαν υπολογιστικά / μαθηματικά μοντέλα ή *in vitro* συστήματα που να πληρούν τους στόχους του πειράματος για να αντικαταστήσουν τη χρήση των πειραματόζων στην παρούσα έρευνα. Μετά από έρευνα της βιβλιογραφίας (PubMed, Scopus, Web of Science) και χρησιμοποιώντας μόνες τους ή συνδυαστικά τις σχετικές προς το θέμα λέξεις κλειδιά (rat as a model, rat versus human, free radicals, reactive species, oxidative stress, redox homeostasis, lipid peroxidation, protein oxidation, biomarkers, antioxidants, wine extracts, polyphenols), δεν βρέθηκαν εργασίες με παρόμοιο πειραματικό σχεδιασμό και επομένως το προτεινόμενο πείραμα είναι πρωτότυπο.

6.2.5 Προέλευση πειραματόζων

Τα πειραματόζωα ήταν δωρεά του κ. Κωσταντίνου Πάντου, καθηγητή και διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, της Ιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα τα ζώα προήλθαν από την Εγκατάσταση Εκτροφής, Προμήθειας και Χρήσης Ζώων του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας (ΕΖΕΦΙΣ) με κωδικό EL25 BIO 9. Η σχετική βεβαίωση βρίσκεται στο παράρτημα στο τέλος της διατριβής.

6.2.6 Εκτροφή ζώων και νεκροτομή

Η εκτροφή των ζώων έγινε στην εγκατάσταση χρήσης πειραματόζων του Εργαστηρίου Κλινικής Φαρμακολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του τμήματος Ιατρικής ΑΠΘ με Κωδικό εγκατάστασης (για μύες, επίμυες) EL-54-BIOexp-04 με υπεύθυνο εγκατάστασης χρήσης την κα. Χρυσούλα Πουρζιτάκη, καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και υπεύθυνο κτηνίατρο τον κ. Ιωάννη Ταϊτζόγλου, καθηγητή του τμήματος κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η σχετική γνωμάτευση της Επιτροπής αξιολόγησης του Πρωτοκόλλου (ΕΑΠ) του Εργαστηρίου Κλινικής Φαρμακολογίας του Τμήματος της Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης καθώς και η τελική άδεια από την Ελληνική Δημοκρατία, Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας, Γενική δ/ση Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής, Διεύθυνση Κτηνιατρικής ΠΚΜ, Τμήμα Υγείας Ζώων & Κτηνιατρικής Αντίληψης, Φαρμάκων και Εφαρμογών (ΥΖ- ΚΑΦΕ), βρίσκεται στο παράρτημα στο τέλος της διατριβής.

6.2.7 Πειραματόζωα και συνθήκες διαβίωσης

Στο πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, έλαβαν μέρος 12 επίμυες, γένους αρσενικού και φυλής Wistar. Η ηλικία των επίμυων κατά την έναρξη του πρωτοκόλλου ήταν 20 εβδομάδες.

Οι 12 επίμυες σχημάτισαν τυχαία 2 ομάδες αποτελούμενες από 6 ζώα η κάθε μια. Η στέγαση των ζώων έγινε σε ομαδικά κλουβιά, καθένα από τα οποία περιείχε 3 επίμυες. Η θερμοκρασία του χώρου ήταν ρυθμισμένη στους $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, η υγρασία διατηρούνταν μεταξύ 40 και 70%, ενώ τέλος υπήρχε τεχνητός φωτισμός ο οποίος ρύθμιζε την φωτοπερίοδο της ημέρας και νύχτας ανά 12 ώρες.

Για την καλύτερη προσαρμογή των πειραματόζώων και την αποφυγή τυχόν στρες που είχε να κάνει τόσο με την μεταφορά τους αλλά και με τον εγκλιματισμό τους με τα άλλα ζώα του κλουβιού, διατηρήθηκε περίοδος προσαρμογής η οποία κράτησε μία εβδομάδα. Στη χρονική αυτή περίοδο τα ζώα είχαν διαθέσιμο φρέσκο νερό και ξηρά τροφή (πέλλετ) σε καθημερινή βάση για κατανάλωση κατά βούληση. Το πέλλετ ήταν ειδικά σχεδιασμένο για ζώα εργαστηρίου. Τέλος με ειδικό οικολογικό χρώμα, έγινε η σήμανση κάθε επίμυ ώστε να γίνει μοναδικός, και εύκολα αναγνωρίσιμος.

6.2.8 Χορήγηση ουσίας στα ζώα

Στα 2 κλουβιά που περιείχαν τα 6 ζώα της ομάδας ελέγχου χορηγούνταν μέσα στο πόσιμο νερό τους τα 1,5 ml του απεσταγμένου νερού ενώ στα 2 κλουβιά με τα 6 ζώα της ομάδας που θα λάμβαναν το εκχύλισμα προσθέτονταν καθημερινά τα 1,5 ml του διαλύματος με το απεσταγμένο νερό και το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου που είχε παρασκευαστεί. Η χορήγηση των διαλυμάτων αυτών έγινε για 14 ημέρες την ίδια ώρα με την ανανέωση του πόσιμου νερού τους.

6.2.9 Έλεγχος της υγείας και ανάπτυξης των ζώων

Η τροφή και το νερό που κατανάλωσαν τα ζώα, καταγραφόταν καθημερινά, ενώ το σωματικό τους βάρος καταγράφηκε την 1^η και την 7^η ημέρα χορήγησης του εκχυλίσματος καθώς και την 15^η ημέρα, (1^η ημέρα μετά την διακοπή της χορήγησης του εκχυλίσματος), όπου και πραγματοποιήθηκε η ευθανασία των ζώων. Για την εύρεση του ρυθμού ανάπτυξης υπολογίστηκε η διαφορά μεταξύ του τελικού από το αρχικό βάρος διαιρεμένο με τις 14 ημέρες χορήγησης του εκχυλίσματος.

Κατά την διάρκεια του πειράματος των 14 ημερών γινόταν καθημερινά από τον κτηνίατρο Ιωάννη Ζερβό, Επίκουρο καθηγητή Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και την Υπεύθυνη υλοποίησης του πρωτοκόλλου, κα. Μαρία Τσανταρλιώτου, Κτηνίατρος, Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, έλεγχος της συμπεριφοράς των ζώων τόσο εντός όσο και εκτός του κλουβιού. Ακολουθούσε κλινική εξέταση για την παρουσία συμπτωμάτων στο δέρμα, το μυοσκελετικό, το νευρικό το πεπτικό το αναπνευστικό, το καρδιαγγειακό, το ουρογεννητικό και τους οφθαλμούς. Η θνησιμότητα ή θνητότητα ελεγχόταν καθημερινά 12 ώρες μετά την χορήγηση του εκχυλίσματος. Οι παρατηρήσεις καταγράφονταν καθημερινά σε πίνακες, ενώ υποδείγματα αυτών υπάρχουν στο παράρτημα στο τέλος της διατριβής. Μαζί με τη ζύγιση των ζώων την 1^η, 7^η και 15^η ημέρα πραγματοποιήθηκε και νευρολογική εξέταση, τα αποτελέσματα της οποίας διατηρήθηκαν σε δελτία, ενώ υπόδειγμα αυτών υπάρχει επίσης στο παράρτημα στο τέλος της διατριβής. Όλοι οι παραπάνω χειρισμοί πραγματοποιούνταν την ίδια ώρα κάθε πρωί.

Αν και από τη σχετική βιβλιογραφία για παρόμοια πειραματικά πρωτόκολλα με εκχυλίσματα οίνων δεν αναμενόταν να υπάρχουν σοβαρές διαταραχές, στο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στην παρούσα διατριβή, αναφερόταν ρητά ότι σε ενδεχόμενη έντονη διαταραχή της ευζωίας των ζώων, θα πραγματοποιούνταν ευθανασία του ζώου και νεκροτομή.

Οι συνθήκες διαβίωσης, ο χειρισμός και η ευθανασία των ζώων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες για την φροντίδα και διαχείριση των ζώων εργαστηρίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τέλος, στο πείραμα δόθηκε πολύ μεγάλη προσοχή στη λεπτότητα και την τελειοποίηση των τεχνικών χειρισμού και πειραματισμού, έτσι ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο η πιθανότητα πρόκλησης δυσφορίας, ταλαιπωρίας, αγωνίας, πόνου ή μόνιμης βλάβης στα πειραματόζωα. Η υπεύθυνη υλοποίησης πρωτοκόλλου ήταν η κα. Μαρία Τσανταρλιώτου, Κτηνίατρος, Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, που πραγματοποίησε τους χειρισμούς του πρωτοκόλλου, η οποία έχει πολύ μεγάλη εμπειρία στη χρήση πειραματόζωων με 26 έτη εμπειρίας σε παρόμοια πειραματικά μοντέλα και πιστοποιημένη βασική εκπαίδευση στη χρήση ζώων εργαστηρίου.

6.2.10 Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι

Με το πέρας των 14 ημερών, τα ζώα στερήθηκαν τροφής για μία νύχτα και την επόμενη μέρα το πρωί αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο. Ο έλεγχος του βάθους της αναισθησίας πραγματοποιήθηκε με τη μύση της κόρης του οφθαλμού, ο έλεγχος για αντανάκλαστικά από τα βλέφαρα καθώς και τα αντανάκλαστικά από την απόσυρση του άκρου ποδός μετά από νύξη. Μετά την αναισθησία πραγματοποιήθηκε διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας και με καρδιακή παρακέντηση της δεξιάς κοιλίας έγινε λήψη αίματος (συνολική ποσότητα 1ml αίματος σε φιαλίδιο με EDTA για αιματολογική εξέταση και 2ml σε φιαλίδιο με ηπαρίνη για βιοχημικές εξετάσεις).

Το αίμα που συλλέχθηκε, τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο και στα 1.500 rpm για 15 λεπτά. Στην συνέχεια το πλάσμα τοποθετήθηκε σε tubes των 1,5ml στον ξηρό πάγο όπως και τα ερυθροκύτταρα (RBCL). Μικρή ποσότητα μεταφέρθηκε απευθείας σε μικροβιολογικό εργαστήριο όπου και προσδιορίστηκαν αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Λάρισα, για περαιτέρω αναλύσεις.

Προσδιορίστηκαν οι ακόλουθες αιματολογικές παράμετροι με έναν αιματολογικό αναλυτή ADVIA120, (Siemens Healthineers): αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνη, αιματοκρίτης, μέσος όγκος ερυθρών, μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης, μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός και μέσος όγκος αιμοπεταλίων. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι βιοχημικές παράμετροι: αλανίνο-αμινοτρανσφεράση (ALT), αλκαλική φωσφατάση (ALP), ολικές πρωτεΐνες, αλβουμίνη, κρεατινίνη, ουρία, γ-GT, με αναλυτή VitalabFlexorE, VitalScientificN.V.,(TheNetherlands).

6.2.11 Νεκροτομή

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της αιμοληψίας και εφόσον υπήρχε ακόμα η επήρεια του ισοφλουράνιου, πραγματοποιήθηκε απεξάρθρωση του 1^{ου} αυχενικού σπονδύλου, με αποτέλεσμα τον θάνατο του ζώου. Στην συνέχεια έλαβε χώρα λεπτομερής νεκροψία. Έγινε λεπτομερής έλεγχος του σώματος συμπεριλαμβανομένου του δέρματος, του τριχώματος και των βλεννογόνων. Επιπλέον ελέγχθηκε η στοματική

και ρινική κοιλότητα, ο πρωκτός και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα. Ακόμα εξετάστηκε λεπτομερώς η κρανιακή, θωρακική και κοιλιακή κοιλότητα καθώς και όλα τα εσωτερικά όργανα.

Ο εγκέφαλος, τα μάτια, οι πνεύμονες, η καρδιά, ο στόμαχος, το ήπαρ, οι νεφροί, ο σπλήνας, το πάγκρεας, το λεπτό και το παχύ έντερο, οι όρχεις και ο αριστερός τετρακέφαλος αφαιρέθηκαν προσεκτικά και καθαρίστηκαν από πιθανούς συνδεδεμένους ιστούς (π.χ. συνδετικός ιστός και λίπος). Τα κοίλα όργανα ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενο και στη συνέχεια καθαρίστηκαν. Ένα μέρος των οργάνων τοποθετήθηκε σε κασέτες και υγρό άζωτο για ανάλυση βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ενώ το υπόλοιπο τοποθετήθηκε σε κασέτες και φορμόλη για Ιστοπαθολογική ανάλυση. Τα δεδομένα της νεκροτομής καταγράφηκαν σε ειδικά φύλλα αναφοράς, υπόδειγμα του οποίου βρίσκεται στο παράρτημα στο τέλος της διατριβής. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Λάρισα, για περαιτέρω αναλύσεις.

6.2.12 Ιστοπαθολογία

Τα τμήματα των οργάνων που απομονώθηκαν για την ιστοπαθολογική ανάλυση σταθεροποιήθηκαν σε πρώτη φάση σε διάλυμα φορμόλης 10% και ουδέτερου pH. Στη δεύτερη φάση οι ιστοί επεξεργαστήκαν με αλκοόλη και έγινε ενσωμάτωση σε παραφίνη ενώ τέλος έγινε τεμαχισμός σε τμήματα πάχους 5μm. Στις τομές αυτές πραγματοποιήθηκε χρώση με αιματοξυλίνη/ηωσίνη.

Τα ιστοτεμάχια παρατηρήθηκαν κάτω από το φως μικροσκοπίου NIKON Eclipse E400 και αξιολογήθηκαν ως προς την αρχιτεκτονική, την κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση, τη φλεγμονώδη διήθηση, τις αιμοδυναμικές βλάβες και τις διαταραχές κυτταρικής αύξησης. Η ένταση των ευρημάτων χαρακτηρίστηκε ως ελάχιστη, ήπια, μέτρια, σημαντική και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε πίνακες, παράδειγμα των οποίων βρίσκεται στο παράρτημα στο τέλος της διατριβής. Η ιστοπαθολογική ανάλυση έγινε με την βοήθεια της κα. Χαριτίνης Νέγκα, Ιατρού – κυτταροπαθολόγου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

6.2.13 Ομογενοποίηση των ιστών και επεξεργασία ερυθροκυττάρων.

Για την ομογενοποίηση των ιστών χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή ομογενοποίησης (Bertin, Minilys) όπου προστέθηκε το δείγμα και PBS (Phosphate Buffer Saline, pH = 7.4, Gibco) το οποίο περιείχε μείγμα με αναστολείς πρωτεασών σε αναλογία ιστού και PBS 1:3. Στην συνέχεια έγινε χρήση συσκευής υπερήχων για 1 λεπτό σε 70% πλάτος κύματος, και 0,7 δευτερόλεπτα διάρκεια κύκλου. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση με συνθήκες 15.000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Με τη λήξη της φυγοκέντρησης πραγματοποιήθηκε συλλογή του υπερκείμενου και αποθήκευση του σε υπερκαταψύκτη στους -80°C. λες οι διαδικασίες με τους χειρισμούς των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε φελιζόλ με πάγο.

Τα ερυθροκύτταρα επεξεργάστηκαν με την προσθήκη απεσταγμένου H₂O σε αναλογία 1:1 v/v. Στη συνέχεια έγινε ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 4000 g και σε θερμοκρασία 4 °C. Με το πέρας της φυγοκέντρησης έγινε συλλογή του υπερκείμενου ερυθροκυτταρικού αιμόλυματος το οποίο μεταφέρθηκε σε νέα tubes και αποθηκεύτηκε μέχρι να αξιολογηθεί σε υπερκαταψύκτη -80°C.

Στο ίζημα που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση και περιείχε τα ερυθροκύτταρα, προστέθηκε απεσταγμένο H₂O με αναλογία 1:1 v/v, και στη συνέχεια έγινε ανάδευση σε κυκλικό αναδευτήρα. Τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου για 15 λεπτά στις 4.000 g και σε θερμοκρασία 4 °C. Από τη φυγοκέντρηση κάθε φιαλιδίου συλλέχθηκε το υπερκείμενο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, το οποίο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

6.2.14 Προσδιορισμός αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin – Hb) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Για τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα που δημιουργήθηκε με την μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω. Σε αυτό πραγματοποιήθηκε η μέθοδος hemiglobincyanide (HiCN) με τη χρήση του αντίστοιχου κιτ της Dutch Diagnostics (Zutphen, Ολλανδία). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον παραπάνω πίνακα.

Πίνακας 31: Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
R1 (Working reagent), pH7.3 (1:10)	1mL	1mL
Απεσταγμένο νερό	5μL	—
Αιμόλυμα	—	5μL
Επώαση 10 λεπτά σε σκοτάδι, φωτομέτρηση στα 540nm		

Υπολογισμοί

$$\text{Hb} \left(\frac{\text{g}}{\text{dl}} \right) = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) \times 29.4$$

που:

29.4	Συντελεστής αραίωσης
------	----------------------

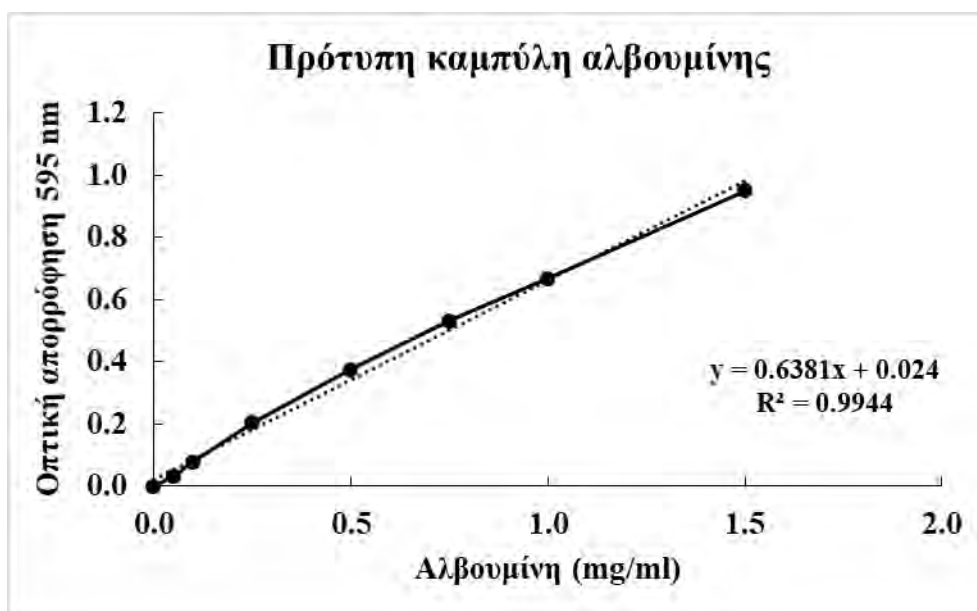
6.2.15 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητα πρωτεΐνης ιστών και πλάσματος με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε ιστούς και πλάσμα απαιτούνταν η δημιουργία πρότυπης καμπύλης με την βοήθεια της αλβουμίνης και με βάση την καμπύλη αυτή έγινε ο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης υπολογίστηκε με τους συντελεστές a και b που προέκυψαν από την εξίσωση της αλβουμίνης σε mg/ml. Η εξίσωση έχει την μορφή $y = ax + b$. Το κάθε δείγμα προσδιορίστηκε 3 φορές.

Η προσθήκη των αντιδραστηρίων έγινε σύμφωνα με τα κάτωθι:

Πίνακας 32: Οι ποσότητες και η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Αντιδραστήριο Bradford	1mL	1mL
Απεσταγμένο νερό	20μL	—
Πλάσμα/Ομογενοποίηση ιστού	—	20μL
Επώαση 15 λεπτά σε σκοτάδι, φωτομέτρηση στα 595nm		



Εικόνα 95. Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης, γραμμικό τμήμα από 0.5 έως 1.5 mg/ml

6.2.16 Προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Αρχή της μεθόδου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της GSH βασίζεται στην αντίδραση οξείδωσης του μορίου με το διθειοδυο-νιτρο-βενζοϊκό-οξύ (DTNB) και το σχηματισμό GSSG και ενός έγχρωμου προϊόντος, το οποίο ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 412nm (Reddy et al., 2004; A. Veskoukis et al., 2019; A. S. Veskoukis et al., 2016).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός κάθε δείγματος:

500μl TCA 5% και 500μl RBCL αναμίχθηκαν και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 15.000g, για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης 300μl από το υπερκείμενο αναδεύτηκαν με 90μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου σε συνθήκες 15.000g, για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε εκ νέου και προστέθηκαν τα παρακάτω.

Πίνακας 33: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης σε αίμα.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660μL	660μL
Απεσταγμένο νερό	20μL	—
Αιμόλυμα	—	20μL
DTNB 1mM σε 1% Trisodium Citrate σε dH ₂ O	330μL	330μL
Επώαση 15 λεπτά σε σκοτάδι, φωτομέτρηση στα 412nm		

Υπολογισμοί

$$GSH \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g Hb}} \right) = \frac{\left[\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{13,6} \right) \times 262,6 \right] \times 1000}{Hb \left(\frac{\text{g}}{\text{l}} \right)}$$

που:

262.6	Συντελεστής αραίωσης (προκύπτει από τελικό όγκο 1010μL/20μL όγκο ιστού =50.5) πολλαπλασιασμένος επί 2 για να ληφθεί υπόψιν η αρχική αραίωση με την προσθήκη dH ₂ O κατά τη διαδικασία λύσης των ερυθροκυττάρων (1:1) και τέλος πολλαπλασιαζόμενος ξανά με το 2 και το 1,3 για να υπολογιστεί η αραίωση που έγινε κατά τον καθαρισμό με τις δύο προσθήκες του TCA
1000	Μετατρέπουμε τα mmol/l σε μmol/l
13.6	Συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός κάθε δείγματος:

100μl από τον ιστό που ομογενοποιήθηκε με την διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω αναμίχθηκαν με 5% TCA και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 15.000g για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και προστέθηκαν τα παρακάτω.

Πίνακας 34. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης σε ιστούς.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7,95	660μL	660μL
PBS	20μL	—
Καθαρισμένο ομογενοποίημα	—	20μL
DTNB 1mM σε 1% Trisodium Citrate σε dH ₂ O	330μL	330μL
Επώαση 15 λεπτά σε σκοτάδι, φωτομέτρηση στα 412nm		

Υπολογισμοί

$$\text{GSH} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left[\left(\frac{\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}}{13,6} \right) \times 2 \times 3 \times 50,5 \right]}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

που:

13,6	Συντελεστής μοριακής απ. σβεσης του DTNB (L/mmol/cm)
50,5	Συντελεστής αραίωσης (DF), προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μl) με τον όγκο του δείγματος (20 μl) (1010/20 = 50,5)
4	Αραίωση κατά την ομογενοποίηση
2	Αραίωση με TCA 5% (50 μl / 50 μl)

6.2.17 Προσδιορισμός της Καταλάσης (CAT, ρυθμός αποικοδόμησης του H₂O₂)Αρχή της μεθόδου

Το H₂O₂ είναι ένα παράγωγο του μεταβολισμού των κυττάρων που παρουσιάζει μεγάλη τοξικότητα και η μετατροπή του σε άλλες λιγότερο τοξικές ενώσεις πραγματοποιούνται από την καταλάση και άλλες περοξειρεδοξίνες, ένζυμα τα οποία το μετατρέπουν σε νερό και οξυγόνο (Aebi, 1984; A. Veskoukis et al., 2019; A. S. Veskoukis et al., 2016).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Για τον προσδιορισμό του ρυθμού αποικοδόμησης του H₂O₂ προστέθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 35: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό δραστηριότητας καταλάσης σε αίμα.

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7,4	2991μL
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4μL

Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και επώαση για 10 λεπτά, στους 37 °C σε κλίβανο. Τέλος έγινε μεταφορά του περιεχομένου σε κυψελίδα χαλαζία και προσθήκη 5μl 30% H₂O₂, σύντομη ανάδευση και φωτομέτρηση των δειγμάτων σε χρονικό διάστημα 125 δευτερολέπτων στα 240nm

Υπολογισμοί

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left(\frac{U}{mg \text{ Hb}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{\text{δείγματος}}}{min} \right)}{40} \times 750 \times 10 \times 2 \times 1000$$

$$Hb \left(\frac{mg}{mL} \right)$$

που:

40	συντελεστής μοριακής απ	ς του H ₂ O ₂ (mol/L)
1000	μετατροπή σε μmol/mL	
750	πα γοντας αραιώσης (προκύπτει απ	00 μL τελικού κου /4 μL),
10	προκύπτει απ	ην 1:10 v/v αραιώση του RBCL
2	προκύπτει απ	ην 1:1 λύση των ερυθροκυττ ρων

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Οι ακόλουθοι όγκοι προστέθηκαν διαδοχικά όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 36. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό δραστηκότητας καταλάσης σε ιστούς.

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7,4	2990μL
Ομογενοποίηση ιστού (στο ήπαρ πραγματοποιήθηκε αραιώση 1/40)	5μL
Ανάδευση και Επώαση 10 λεπτών στους 37°C	
Μεταφορά του περιεχομένου σε κυψελίδα Quartz και προσθήκη 5μL 30% H ₂ O ₂	
Ανάμειξη και μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων στα 240nm στα 5 και στα 125 δευτερόλεπτα	

Υπολογισμοί

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του H}_2\text{O}_2 \left(\frac{\text{U}}{\text{mg πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}}}{\text{min}} \right) \times Y \times Z \times 3 \times 1000}{40 \times \text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

που:

40	Μοριακός συντελεστής απορρόφησης του H ₂ O ₂ (L/mol/cm)
1000	μετατρέπει από mol / L σε μmol / ml
75	Συντελεστής αραίωσης, προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3000 μl) με τον όγκο του δείγματος (40 μl) (3000/40 = 75)
4	Αραίωση του δείγματος (1/4) κατά την ομογενοποίηση
U	μmol / λεπτό
Δ	Abs (min), η μεταβολή στην απορρόφηση σε ένα λεπτό

6.2.18 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Αρχή της μεθόδου

Με την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται μια συνολική αξιολόγηση της ικανότητας των διαφόρων συστατικών του πλάσματος και των ιστών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγωγή της τεχνητής ρίζας DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) στην αντίστοιχη υδραζίνη με την προσθήκη ατόμων υδρογόνου. Η αναγωγή της ρίζας προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 520 nm (Janaszewska & Bartosz, 2002; A. Veskoukis et al., 2019).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας προστέθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 37: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της TAC στο αίμα.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7,4	500μL	480μL
DPPH 0.1 mM	500μL	500μL
Πλάσμα	—	20μL
Επώαση 60 λεπτά σε σκοτάδι, φυγοκέντρηση 15.000g, 25°C, 3 λεπτά, φωτομέτρηση στα 520nm		

Υπολογισμοί

$$\frac{\text{mmol DPPH που εξουδετερώθηκαν}}{\text{ml πλάσματος}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ μείωση Abs}}{100} \right) \times 50 \times 50}{1000}$$

που:

100	μετατροπή ποσοστιαίας μείωσης απο ησης σε απλή μείωση
50	η συγκ ρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας
50	η αραιώση του πλ σματος στην κυψελίδα (1000 μl/20 μl)
1000	μετατροπή L σε mL

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Οι ακόλουθοι όγκοι προστέθηκαν διαδοχικά όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 38 : Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της TAC στους ιστούς.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7,4	500μL	460μL
DPPH 0.1 mM	500μL	500μL
Ομογενοποιημένος ιστός (αραίωση ½)	—	40μL
Επώαση 60 λεπτά σε σκοτάδι, φυγοκέντρωση 15.000g, 25°C, 3 λεπτά, φωτομέτρηση στα 520nm		

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i)	% μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό : % Abs μείωση = (Abs τυφλού – Abs δείγματος) / Abs τυφλού x 100
ii)	μmol DPPH που ανήχθησαν/ mL ιστού: (% Abs μείωση / 100) x 50 x 25 x 4.x 2] / 1000

που:

100	Μετατροπή της μείωσης της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης
50	Συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol / L κυψελίδας.
25	Αραίωση του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μl στην κυψελίδα / 40 μl δείγματος ιστού στην κυψελίδα = 25)
4	Αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίηση
2	Αραίωση του δείγματος κατά το δοσολόγιο
1000	Μετατροπή των L του δείγματος σε ml του δείγματος

Για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης της TAC χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος: $\text{mmol DPPH (mmol / mg συνολικής πρωτεΐνης)} = \text{mmol DPPH nmol / ml} / \text{συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης mg / ml}$.

6.2.19 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξείδωσης γίνεται η ανίχνευση της μαλονδιαλδεϋδης (MDA) που προέρχεται από το διαχωρισμό υπεροξειδίων των λιπιδίων που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 530nm (Keles et al., 2001; A. Veskoukis et al., 2019).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Για τον προσδιορισμό των TBARS προστέθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 39: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των TBARS στο αίμα.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Πλάσμα	—	100μL
Απεσταγμένο νερό	100μL	—
TCA 35%	500μL	500μL
Tris-HCL 200 mM, pH 7.4	500μL	500μL
Επώαση για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου		
NaSO ₄ (2M) – TBA (55mMM)	1mL	1mL
Επώαση 45 λεπτά, 95°C σε υδατόλουτρο, μεταφορά σε πάγο για 5 λεπτά		
TCA 70%	1mL	1mL
Μεταφορά 1mL σε Eppendorf tubes, φυγοκέντρηση 11.200g, 25°C, 3 λεπτά, Φωτομέτρηση στα 530 nm		

Υπολογισμοί

$$TBARS \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{l πλάσματος}} \right) = \left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31$$

31	Συντελεστής αραιώσης (προκύπτει απ 3100 μL τελικ κο / 100 μL κο του πλ σματος= 31)
0.156	Συντελεστής μοριακής απ ς* της MDA /10 ⁻⁶ με σκοπ να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L
*Ο συντελεστής μοριακής απ βεσης μιας ουσίας ισούται με την απο ση της ουσίας αυτής σε συγκ ντρωση 1 mol/L.	

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Οι ακόλουθοι όγκοι προστέθηκαν διαδοχικά όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 40. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των TBARS στους ιστούς.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Ομογενοποίηση ιστού	—	100μL
PBS	100μL	—
TCA 35%	500μL	500μL
Tris-HCL 200 mM, pH 7,4	500μL	500μL
Επώαση 10 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου		
NaSO4 (2M) – TBA (55mMM)	1mL	1mL
Επώαση 45 λεπτά, 95°C σε υδατόλουτρο, μεταφορά σε πάγο για 5 λεπτά		
TCA 70%	1mL	1mL
Μεταφορά 1mL σε Eppendorf tubes, φυγοκέντρηση 11.200g, 25°C, 3 λεπτά, Φωτομέτρηση στα 530 nm		

Υπολογισμοί

$$TBARS \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \left[\frac{\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31 \times 3}{\frac{1000}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{ml} \right)}} \right] \times 1000$$

που:

<u>31</u>	Συντελεστής αραίωσης (προκύπτει απ 3100 μL τελικ γκο / 100 μL γκο του ομογενοποιημ νου ιστού = 31)
<u>0.156</u>	Συντελεστής μοριακής απ σβεσης* της MDA
<u>4</u>	αραίωση ομογενοποίησης
<u>3</u>	3 φορ ς αραίωση δείγματος κατ τη μ τρηση
* Ο συντελεστής μοριακής απ βεσης μιας ουσίας ισούται με την απο ση της ουσίας αυτής σε συγκ ντρωση 1 mol/L.	

6.2.20 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων γίνεται λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τη χρωστική 2,4-δινιτρι-φαινυλδραζίνη (DNPH) που έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου), μιας ένωσης που μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 375 nm (Patsoukis et al., 2004; A. Veskoukis et al., 2019; A. S. Veskoukis et al., 2016).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων προστέθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 41: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των Carbs στο αίμα.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα	
Πλάσμα	50μL	50μL	
TCA 20%	50μL	50μL	
Ανάδευση, επώαση 15 λεπτά σε πάγο, φυγοκέντρωση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου			
DNPH 14mM (σε 2.5N HCL)	—	500μL	
2.5N HCL	500μL	—	
Διάλυση pellet, επώαση 60 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου, ανάδευση ανά 15 λεπτά			
Φυγοκέντρωση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου			
TCA 10%	1mL	1mL	
Ανάδευση, φυγοκέντρωση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου			X3
Μείγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v)	1mL	1mL	X3
Ανάδευση, φυγοκέντρωση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου			
5M ουρία, pH 2,3	1mL	1mL	
Ανάδευση και επώαση 37 °C, 15 λεπτά			
Φυγοκέντρωση 15.000g, 4 °C, 3 λεπτά			
Φωτομέτρηση στα 375nm			

Υπολογισμοί

$$CARB \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0.022} \right)}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{ml} \right)} \times 20$$

που:

0,022	συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH
20	συντελεστής αραίωσης του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μl/50 μl πλάσμα ή ιστός).

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Οι ακόλουθοι όγκοι προστέθηκαν διαδοχικά όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 42. Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των Carbs στους ιστούς.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Ομογενοποίηση ιστού	50μL	50μL
TCA 20%	50μL	50μL
Ανάδευση, επώαση 15 λεπτά σε πάγο, φυγοκέντρηση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου		
DNPH 14mM (σε 2.5N HCL)	—	500μL
2.5N HCL	500μL	—
Διάλυση pellet, επώαση 60 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου, ανάδευση ανά 15 λεπτά		
Φυγοκέντρηση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου		
TCA 10%	1mL	1mL
Ανάδευση, φυγοκέντρηση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου		X3

Μείγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v)	1mL	1mL	X3
Ανάδευση, φυγοκέντρηση 15.000g, 4°C, 5 λεπτά, απόρριψη υπερκειμένου			
5M ουρία, pH 2,3	1mL	1mL	
Ανάδευση και επώαση 37 °C, 15 λεπτά			
Φυγοκέντρηση 15.000g, 4 °C, 3 λεπτά			
Φωτομέτρηση στα 375nm			

Υπολογισμοί

$$CARB \left(\frac{nmol}{mg \text{ πρωτεΐνης}} \right) = \frac{\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0.022} \right)}{\text{Πρωτεΐνη} \left(\frac{mg}{ml} \right)} \times 20 \times 3$$

που:

0,022	συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH
20	συντελεστής αραιώσης του δείγματος στην κυψελίδα (1000 μl/50 μl ιστός).
3	η αραιώση που έγινε κατά την ομογενοποίηση του ιστού

Για την κανονικοποίηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος: **Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol / mg πρωτεΐνης) = συγκέντρωση καρβονυλίων nmol / ml / συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης mg / ml**

6.2.21 Προσδιορισμός της δραστηρότητας της αναγωγάσης της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)

Αρχή της μεθόδου

Για τον έλεγχο της δράσης του ενζύμου της SOD προσδιορίζεται το ποσοστό αναστολής του NBT. Πιο αναλυτικά παράγεται O₂^{••} από την παρουσία ξανθίνης και του ενζύμου οξειδάσης της ξανθίνης. Με την προσθήκη του NBT η SOD

εξουδετερώνει τις παραγόμενες ρίζες (Oberley & Spitz, 1984; A. S. Veskoukis et al., 2016).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Για τον προσδιορισμό της δράσης της SOD προστέθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 43: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της SOD στο αίμα.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Πλάσμα	-	100μL
Master Mix	800μL	800μL
DETAPAC	100μL	100μL
Ανάδευση με vortex, μεταφορά του περιεχόμενου σε κυψελίδα, μηδενισμός του φωτομέτρου στα 560nm με το δείγμα ελέγχου		
Οξειδάση της ξανθίνης	100μL	100μL
Ανάδευση και φωτομέτρηση στα 560nm για 90 δευτερόλεπτα.		

Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της σουπεροξειδικής δισμουτάσης έγινε με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστικότητα σουπεροξειδικής δισμουτάσης} = 100\% - \% \text{ αναστολή του NBT}$$

Η διαφορά απορρόφησης του κάθε δείγματος ανά λεπτό υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό} = \text{Abs}_{\text{τελική}} - \text{Abs}_{\text{αρχική}} / 3 \text{ λεπτά}$$

Η διαφορά απορρόφησης του τυφλού ανά λεπτό υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \text{ ανά λεπτό} = \text{Abs}_{\text{τελική}} - \text{Abs}_{\text{αρχική}} / 3 \text{ λεπτά}$$

Η %αναστολή του NBT υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή του NBT} = (\Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \text{ ανά λεπτό} - \Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό}) / \Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \times 100 / \text{g Hb}$$

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Οι ακόλουθοι όγκοι προστέθηκαν διαδοχικά όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 44: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της SOD σε ιστούς.

	Δείγμα ελέγχου	Δείγμα
Ομογενοποίηση	-	100μL
Master Mix	800μL	800μL
DETAPAC	100μL	100μL
Ανάδευση με vortex, μεταφορά του περιεχόμενου σε κυψελίδα, μηδενισμός του φωτομέτρου στα 560nm με το δείγμα ελέγχου		
Οξειδάση της ξανθίνης	100μL	100μL
Ανάδευση και φωτομέτρηση στα 560nm για 90 δευτερόλεπτα.		

Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της σουπεροξειδικής δισμουτάσης έγινε με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστικότητα σουπεροξειδικής δισμουτάσης} = 100\% - \% \text{ αναστολή του NBT}$$

Η διαφορά απορρόφησης του κάθε δείγματος ανά λεπτό υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό} = \text{Abs}_{\text{τελική}} - \text{Abs}_{\text{αρχική}} / 3 \text{ λεπτά}$$

Η διαφορά απορρόφησης του τυφλού ανά λεπτό υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \text{ ανά λεπτό} = \text{Abs}_{\text{τελική}} - \text{Abs}_{\text{αρχική}} / 3 \text{ λεπτά}$$

Η %αναστολή του NBT υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή του NBT} = (\Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \text{ ανά λεπτό} - \Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ ανά λεπτό}) / \Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \times 100 / \text{mg πρωτεΐνης}$$

6.2.22 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx)

Αρχή της μεθόδου

Για τον έλεγχο της δράσης της GPx προσδιορίζεται η οξείδωση του NADPH. Πιο αναλυτικά με την δράση της GPx, η GSH ανάγεται σε GSSH. Έπειτα η GR μετατρέπει την οξειδωμένη GSSH στη δραστική μορφή της GSH με ταυτόχρονη μετατροπή του NADPH σε NADP⁺ το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά στα 340nm (A. S. Veskoukis et al., 2016).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Για τον προσδιορισμό της δράσης της GPx προστέθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 45: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GPx στο αίμα.

	Δείγμα
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/100	100μL
Ρυθμιστικό διαλύμα φωσφορικών	500μL
GR	100μL
GSH	100μL
Επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου	
NADPH	100μL
Επώαση 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου	
Μεταφορά του περιεχομένου σε κυψελίδα	
t-BuOOH	100μL
Φωτομέτρηση στα 340nm για 150 δευτερόλεπτα	

Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης γίνεται με βάση τον τύπο:

Δραστηριότητα περοξειδάσης της γλουταθειόνης (U/g Hb) = $0,868 \times \Delta Abs_{NADPH} / 10 \times 10 \times 100 \times 2 / g \text{ Hb}$.

που:

0,868	συντελεστής μοριακής απόσβεσης του NADPH
10	ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του δείγματος (100μL).
10	η συγκέντρωση της γλουταθειόνης
100	η αραίωση του δείγματος
2	η αραίωση με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Οι ακόλουθοι όγκοι προστέθηκαν διαδοχικά όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 46: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GPx στους ιστούς.

	Δείγμα
ομογενοποιημένος ιστός αραιωμένος με PBS (1:100)	100μL
Ρυθμιστικό διαλύματος φωσφορικών	500μL
GR	100μL
GSH	100μL
Επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου	
NADPH	100μL

Επώαση 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου	
Μεταφορά του περιεχομένου σε κυψελίδα	
t-BuOOH	100μL
Φωτομέτρηση στα 340nm για 150 δευτερόλεπτα	

Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της περοξειδάσης της γλουταθειόνης έγινε με βάση τον τύπο:

Δραστικότητα περοξειδάσης της γλουταθειόνης (U/g ολικής πρωτεΐνης) = $0,868 \times \Delta Abs_{NADPH} / 10 \times 10 \times 100 \times 4 / \text{mg ολικής πρωτεΐνης}$

που:

0,868	συντελεστής μοριακής απόσβεσης του NADPH
10	ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του δείγματος (100μL).
10	η συγκέντρωση της γλουταθειόνης
100	η αραίωση του δείγματος
4	η αραίωση με PBS κατά την ομογενοποίηση

6.2.23 Προσδιορισμός της δραστικότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR)

Αρχή της μεθόδου:

Για τον έλεγχο της δραστικότητας της GR χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο DNTB (2-νιτροβενζοϊκό οξύ) το οποίο ανάγεται. Πιο συγκεκριμένα με τη δραστικότητα της GR η οξειδωμένη γλουταθειόνη μετατρέπεται σε 2 μόρια ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) ενώ ταυτόχρονα οξειδώνεται το NADPH. Η ανηγμένη γλουταθειόνη σχηματίζει με το DTNB το μόριο GSTNB και TNB το οποίο και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 412nm (A. S. Veskovikis et al., 2016).

Πειραματική διαδικασία (αίμα)

Για τον προσδιορισμό της δράσης της GR προστέθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 47: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GR στο αίμα.

	Τυφλό δείγμα	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	700μL	700μL
DTNB	250μL	250μL
β-NADPH	50μL	50μL
Μεταφορά του περιεχομένου σε κυψελίδα		
GSSG	50μL	50μL
Μέτρηση απορρόφησης στα 412nm του τυφλού.		
GR	25μL	25μL
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/100	-	25μL
γρήγορη ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 412nm για 30 δευτερόλεπτα.		

Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης έγινε με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης (U/g Hb)} = 0,868 \times \Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \times 0,026 / \Delta \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \times 10 \times 10 \times 100 \times 2 / \text{g Hb}$$

που:

0,868	συντελεστής μοριακής απόσβεσης του NADPH
10	ο συντελεστής αραιώσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του δείγματος (100μL).
10	η συγκέντρωση της γλουταθειόνης
100	η αραιώση του δείγματος
2	η αραιώση με νερό κατά τη διάρκεια λύσης των ερυθροκυττάρων

Πειραματική διαδικασία (ιστοί)

Οι ακόλουθοι όγκοι προστέθηκαν διαδοχικά όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 48: Διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της GR στους ιστούς.

	Τυφλό δείγμα	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	700μL	700μL
DTNB	250μL	250μL
β-NADPH	50μL	50μL
Μεταφορά του περιεχομένου σε κυψελίδα		
GSSG	50μL	50μL
Μέτρηση απορρόφησης στα 412nm του τυφλού.		
GR	25μL	25μL
Ομογενοποίηση ιστού αραιωμένο με PBS	-	25μL
Γρήγορη ανάδευση και μέτρηση απορρόφησης στα 412nm για 30 δευτερόλεπτα.		

Υπολογισμοί

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης έγινε με βάση τον τύπο:

$$\text{Δραστικότητα αναγωγάσης της γλουταθειόνης (U/mg πρωτεΐνης)} = 0,868 \times \Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \times 0,026 / \Delta \text{Abs}_{\text{οτυφλού}} \times 10 \times 10 \times 100 \times 4 / \text{mg ολικής πρωτεΐνης}$$

που:

0,868	συντελεστής μοριακής απόσβεσης του NADPH
10	ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μL) με τον όγκο του δείγματος (100μL).
10	η συγκέντρωση της γλουταθειόνης
100	η αραίωση του δείγματος
4	η αραίωση με PBS κατά την ομογενοποίηση

6.2.24 Στατιστική

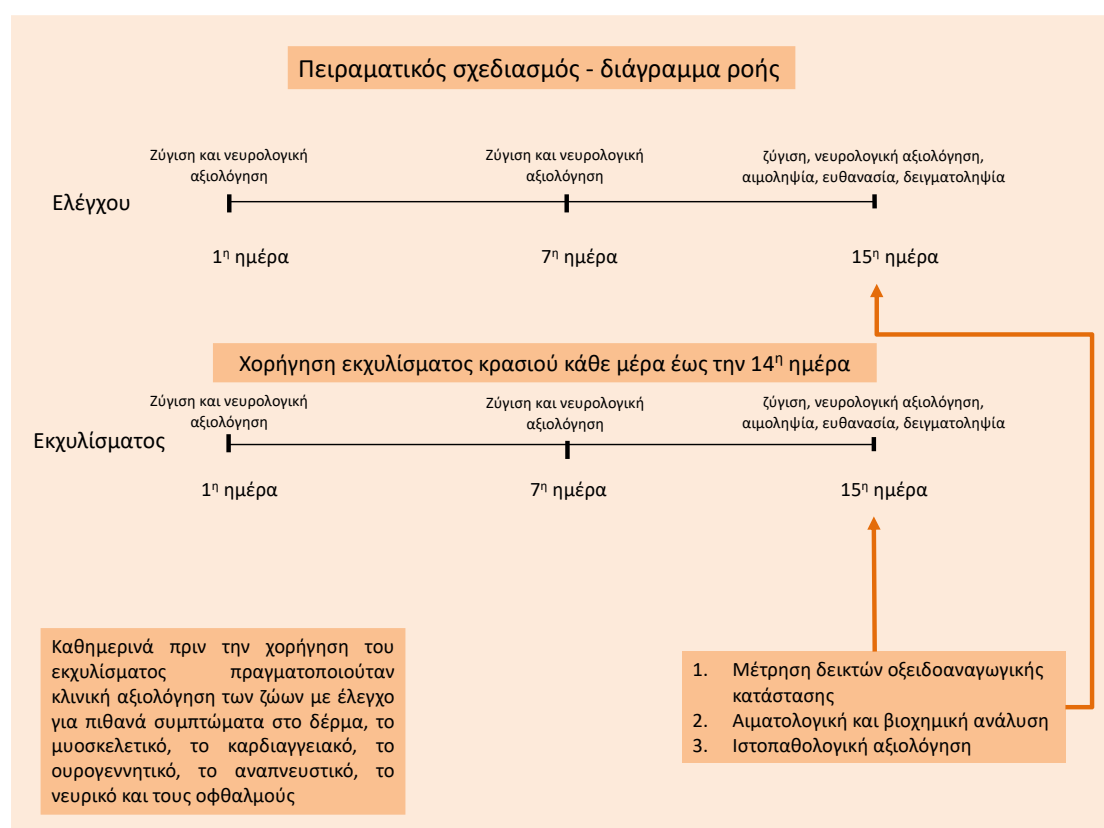
σον αφορά την ιστοπαθολογική ανάλυση, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ SD. Για τα ποσοτικά δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov για να ελεγχθεί αν οι μεταβλητές ακολουθούν την κανονική κατανομή και η δοκιμασία Levene Median για τον έλεγχο της διασποράς. Σε περίπτωση μη φυσιολογικής κατανομής, τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμή Kruskal-Wallis ANOVA. Για τις ποιοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν το Chi-Square (χ^2 test) και το τεστ του Fisher. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 26.0 του SPSS (IBM). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε λιγότερο από 0,05 ($p < 0,05$).

σον αφορά την ανάλυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ SEM χρησιμοποιώντας το Graphpad Prism 9 για MAC OS. Το τεστ Shapiro-Wilk χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί εάν οι μεταβλητές ακολουθούν κανονική κατανομή. Σε περίπτωση μη κανονικής κατανομής, τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη μη παραμετρική δοκιμή Kruskal Wallis ANOVA. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε λιγότερο από 0,05 ($p < 0,05$).

6.3 Αποτελέσματα

6.3.1 Διάγραμμα ροής πειραματικού πρωτοκόλλου χορήγησης εκχυλίσματος

Παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής με βάση το οποίο έγινε η χορήγηση του εκχυλίσματος καθώς και η καθημερινή κλινική εξέταση των πειραματόζων που περιελάμβανε, ζύγιση, νευρολογική αξιολόγηση καθώς και έλεγχο για συμπτώματα στο δέρμα, το μυοσκελετικό, το καρδιαγγειακό, το ουρογεννητικό, το αναπνευστικό, το νευρικό σύστημα και τους οφθαλμούς.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα ροής πειραματικού πρωτοκόλλου χορήγησης εκχυλίσματος

6.3.2 Ανάπτυξη των επίμυων

Κατά την διάρκεια των 14 ημερών που έγινε η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν παρατηρήθηκε κάποια ανεπιθύμητη ενέργεια ούτε προκλήθηκε θνησιμότητα.

Οι 2 ομάδες κατανάλωσαν αντίστοιχη ποσότητα τροφής αλλά και νερού. Το σωματικό βάρος και ο ρυθμός ανάπτυξης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και δεν προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

Πίνακας 49: Σωματικό βάρος πριν και μετά την παρέμβαση καθώς και ο ρυθμός ανάπτυξης.

	1 ^η Ημέρα	14 ^η Ημέρα
Σωματικό βάρος ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα	369,17 ± 22,96gr	396,33 ± 23,21gr
Σωματικό βάρος ομάδας ελέγχου	370,17 ± 13,53gr	397,17 ± 13,66 gr
Ρυθμός ανάπτυξης ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα	1,94 ± 0,12g /ημέρα	
Ρυθμός ανάπτυξης ομάδας ελέγχου	1,93 ± 0,05g / ημέρα	

6.3.3 Κλινική εικόνα των επίμυων

Καθημερινά πριν την χορήγηση του εκχυλίσματος πραγματοποιούνταν κλινική αξιολόγηση των ζώων με έλεγχο για πιθανά συμπτώματα στο δέρμα και τα λειτουργικά συστήματα των επίμυων. Ωστόσο καμία μέρα και σε κανέναν επίμυ δεν διαπιστώθηκε κάποια παρέκκλιση από τη φυσιολογική εικόνα ούτε μεταξύ των ζώων στους ίδιους κλωβούς ούτε μεταξύ των κλωβών. Η νευρολογική αξιολόγηση την 1^η, 7^η και 14^η ημέρα επίσης δεν έδωσε κάποιο παθολογικό εύρημα σε κανέναν από τους επίμυες οποιασδήποτε από τις 2 ομάδες.

6.3.4 Αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι

Οι αναλύσεις από τις αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις δεν έδειξαν τιμές δεικτών εκτός φυσιολογικών ορίων για τη φυλή, το φύλο και την ηλικία των ζώων, ούτε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 ομάδων. Επομένως το εκχύλισμα δεν επηρέασε καθόλου τους αιματολογικούς και βιοχημικούς δείκτες. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 50: Αποτελέσματα αιματολογικών αναλύσεων.

Αιματολογικές παράμετροι (μονάδα μέτρησης)	Ομάδα ελέγχου n=6	Πειραματική Ομάδα n=6
Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων RBC(M/μl)	8,63 ± 0,45	8,42±0,21
Αιμοσφαιρίνη HGB (gr/dL)	15,97 ±0,75	15,46±0,58
Μέσος όγκος ερυθρών MCV(fl)	50,63±0,79	50,64±1,51
Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης MCH(pg)	16,58±0,15	16,42±0,83
Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης MCHC(gr/dL)	32,78±0,60	32,40±0,72
Αιματοκρίτης HCT (%)	44,78±2,94	45,68±1,19
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων WBC(K/μl)	5,78±0,92	5,34±2,34
Ουδετερόφιλα NEUT (K/μl %)	19,77±2,74	26,24±9,82
Λεμφοκύτταρα LYM (K/μl %)	75,67±2,52	70,10±9,99
Μονοκύτταρα MONO (K/μl %)	2,37±0,23	2,08±0,34
Ηωσινόφιλα EOS (K/μl %)	1,37±0,60	0,86±0,38
Βασεόφιλα BASO (K/μl %)	0,70±0,15	0,62±0,08
Αιμοπετάλια PLT (K/μl)	656,33±65,48	645,80±102,47
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων MPV (fl)	7,62±0,56	8,34±0,56

*Οι τιμές αναφέρονται σε μέσους όρους (Mean) ± την τυπική απόκλιση (SD)

Πίνακας 51: Αποτελέσματα βιοχημικών αναλύσεων.

Βιοχημικές παράμετροι	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα εκχυλίσματος
	n = 6	n = 6
Ολικές πρωτεΐνες (gr/dL)	6,7±0,21	6,68±0,23
Αλβουμίνη (g/ml)	4,32±0,12	4,3±0,10
Ουρία (mg/ml)	15,17±4,96	14,33±5,86
Κρεατινίνη(mg/ml)	0,6±0	0,47±0,06
ALT (U/lit)	200,33±11,5	250,67±53,45
ALP (U/lit)	53,17±5,27	51±1,41
γ-GT (U/lit)	0	0

*Οι τιμές αναφέρονται σε μέσους όρους (Mean) ± την τυπική απόκλιση (SD)

6.3.5 Νεκροτομή

Η μακροσκοπική αξιολόγηση των εσωτερικών οργάνων των πειραματόζωων δεν έδειξε διαφορές που είχαν να κάνουν με την υφή, το χρώμα, την σύσταση των οργάνων καθώς και το μέγεθος τους.

Επιπλέον από την αξιολόγηση του περιεχομένου των κοίλων οργάνων δεν παρατηρήθηκε κάτι ασυνήθιστο ή διαφορετικό στις 2 ομάδες και σε όλα τα ζώα, ενώ δεν είχαν παθολογική συγκέντρωση υγρών και δεν είχαν στα τοιχώματα τους εμφανείς παθολογικές αλλοιώσεις.

6.3.6 Ιστοπαθολογική εκτίμηση

Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση δεν έδειξε αλλοιώσεις που να οφείλονται στην χορήγηση του εκχυλίσματος. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στους πνεύμονες των ζώων και των 2 ομάδων. Στις αλλοιώσεις αυτές εμφανίστηκε μεγάλος αριθμός μονοπύρηνων κυττάρων με το μεγαλύτερο πληθυσμό να αποτελείται από τα λεμφοκύτταρα τα οποία βρίσκονταν περιαγγειακά, κυρίως γύρω από τις μεσαίου μεγέθους αρτηρίες σε όλους τους λοβούς των πνευμόνων ενώ σε κάποιες περιπτώσεις πληθυσμός εμφανιζόταν και περιβρογχικά.

Κατά την αξιολόγηση βρέθηκαν εστιακές διηθήσεις από μικτά φλεγμονώδη κύτταρα, μεταξύ των οποίων λεμφοκύτταρα και μακροφάγα αλλά και σπανιότερα ουδετερόφιλα, στο διάμεσο χώρο καθώς και στις κυψελίδες ενώ δεν υπήρχαν εμφανείς ενδείξεις από μολυσματικούς παράγοντες.

Τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν παραπάνω με την ιστολογική αξιολόγηση των πνευμόνων ως προς την παρουσία, την ένταση και το είδος των αλλοιώσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων.

Πίνακας 52: Καταγραφή αποτελεσμάτων της ιστολογικής εξέτασης των οργάνων (πνεύμονας), σύμφωνα με το δελτίο ιστολογικής εξέτασης του παραρτήματος.

Ομάδα ελέγχου	παρξη αλλοιώσεων	Ένταση αλλοιώσεων	Περιγραφή αλλοιώσεων
Πνεύμονας Νο 1			
<i>Αρχιτεκτονική</i>	-	-	
<i>Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση</i>	-	-	
<i>Φλεγμονώδης διήθηση</i>	+	1(ήπια)	Παρουσία λεμφοκυττάρων περιαγγειακά, εντοπισμένα γύρω από τις μεσαίου μεγέθους αρτηρίες σε όλους τους λοβούς των πνευμόνων. Εστιακές διηθήσεις λεμφοκυττάρων και μακροφάγων στο διάμεσο χώρο.
<i>Αιμοδυναμικές βλάβες</i>	-	-	
<i>Διαταραχές κυτταρικής αύξησης</i>	-	-	

Τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης των πνευμόνων ως προς την εμφάνιση αλλοιώσεων για όλους τους επίμυες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων.

Πίνακας 53: Αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης των πνευμόνων ως προς την ύπαρξη αλλοιώσεων.

Πνεύμονας	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα εκχυλίσματος
Παρουσία αλλοιώσεων	n=6	n=6
Αρχιτεκτονική	- ¹	-
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση	-	-
Φλεγμονώδης διήθηση	4 ²	4
Αιμοδυναμικές βλάβες	-	-
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης	-	-

¹ : Απουσία αλλοιώσεων, ²:Αριθμός ζώων με αλλοιώσεις συνολικά

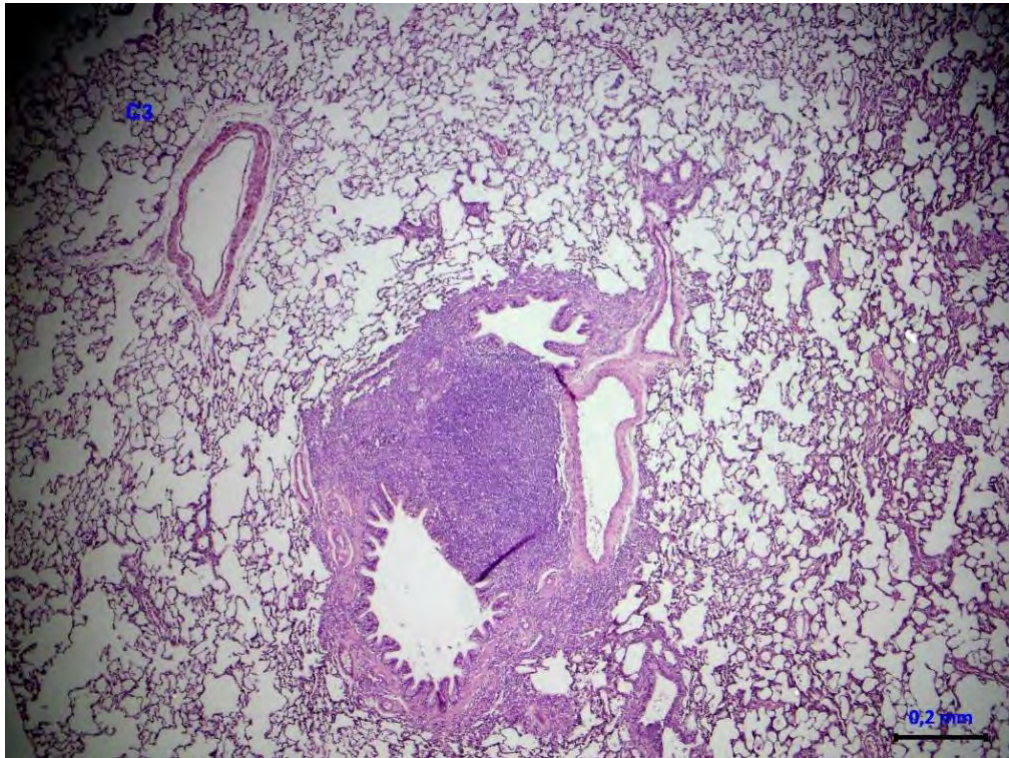
Τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την ένταση των αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν στο σύνολο των επιμύων που εμφάνισαν αλλοιώσεις παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων.

Πίνακας 54: Αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης των πνευμόνων ως προς την ένταση των αλλοιώσεων.

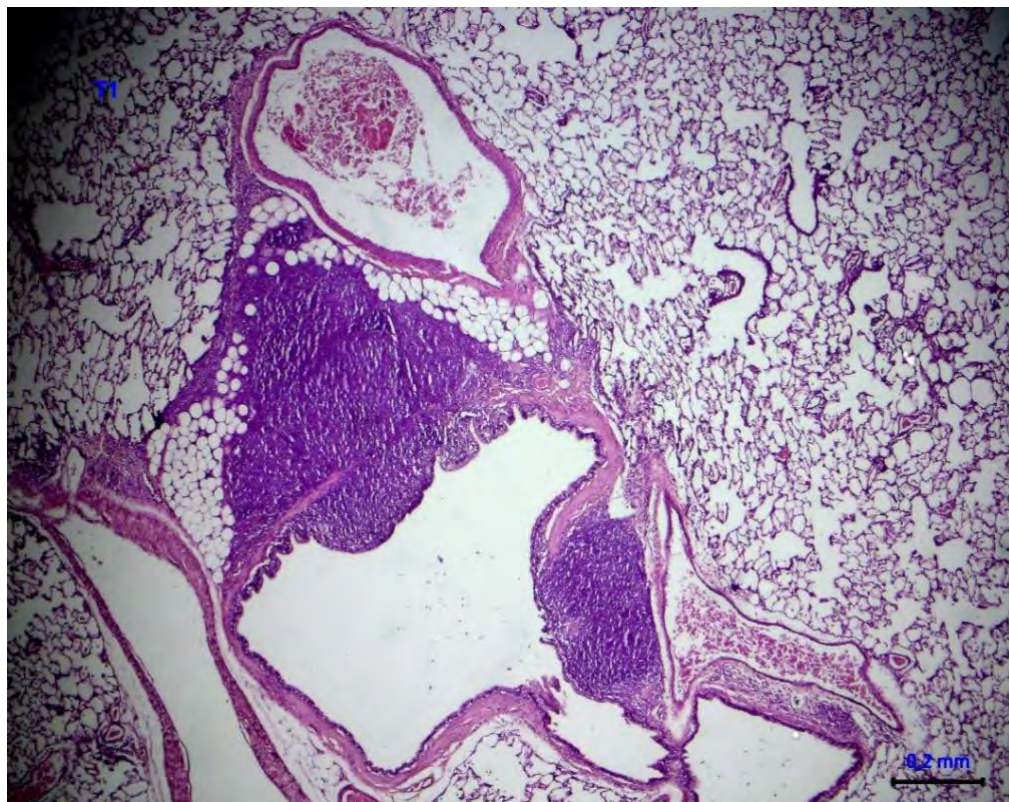
Πνεύμονας	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα εκχυλίσματος
Ένταση αλλοιώσεων	n=4	n=4
Ελάχιστη	-	-
πια	3 ¹	2
Μέτρια	1 ²	2
Σοβαρή	-	-

¹αριθμός ζώων με ένταση αλλοιώσεων ήπια, ² αριθμός ζώων με ένταση αλλοιώσεων μέτρια

Οι αλλοιώσεις των πνευμόνων που εντοπίστηκαν σε επίμνες της ομάδας ελέγχου καθώς και στην ομάδα που της χορηγήθηκε το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου παρουσιάζονται παρακάτω.



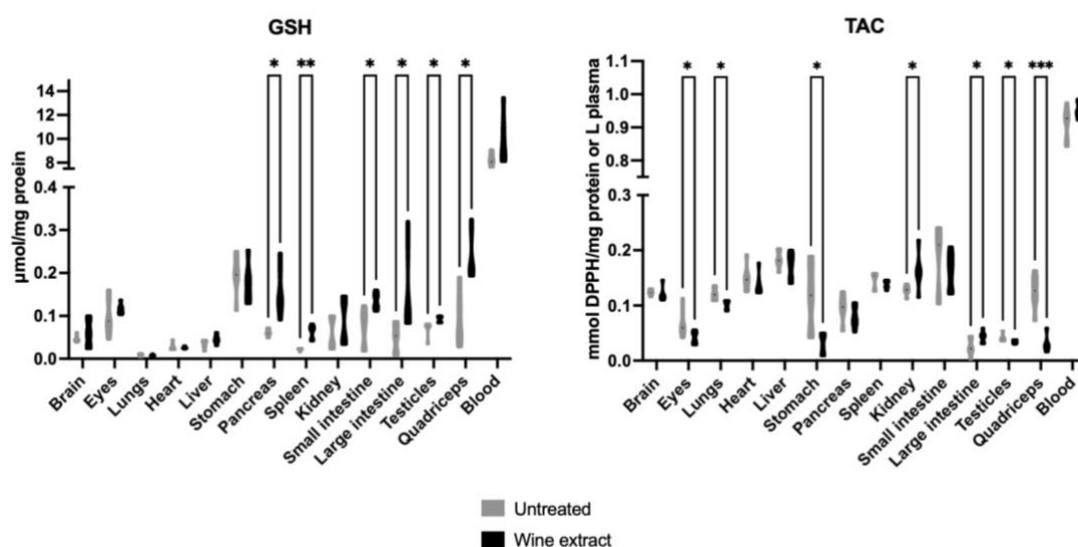
Εικόνα 96: Πνεύμονας επίμνος. Ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 97: Πνεύμονας επίμνος. Ομάδα εκχυλίσματος.

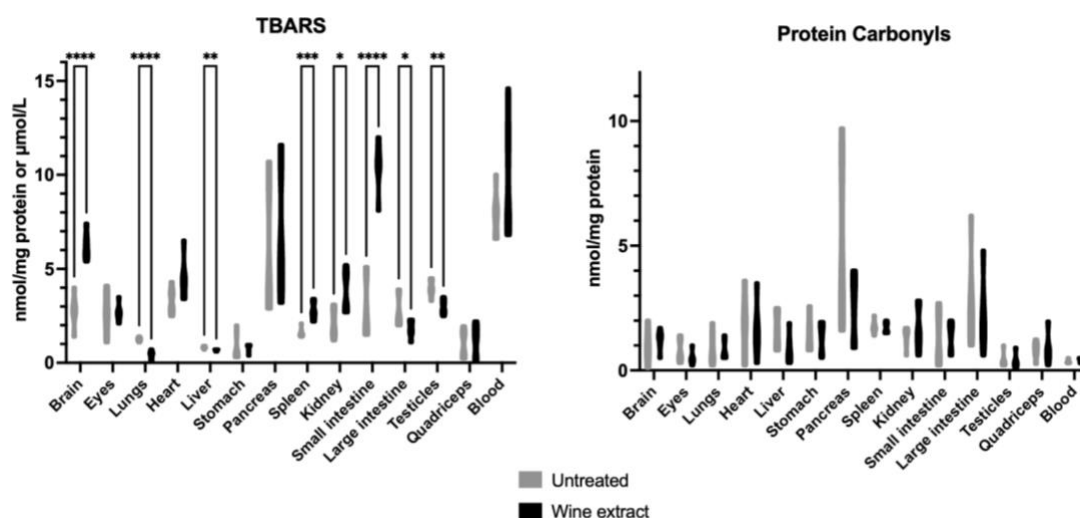
6.3.7 Αποτελέσματα από τις αναλύσεις της οξειδοαναγωγικής κατάστασης

Τα αυξημένα επίπεδα GSH στο πάγκρεας, τον σπλήνα, το λεπτό και το παχύ έντερο, τους όρχεις και τον τετρακέφαλο στους επίμυες που έλαβαν το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα. Τα επίπεδα TAC επηρεάστηκαν αντίστροφα, όπως φαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα στα μάτια, τους πνεύμονες, το στομάχι, τους όρχεις και τον τετρακέφαλο πειραματόζωων που έλαβαν το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου. Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα της TAC στους ιστούς του παχέος εντέρου και των νεφρών αυξήθηκαν στα ζώα που έλαβαν το εκχύλισμα.



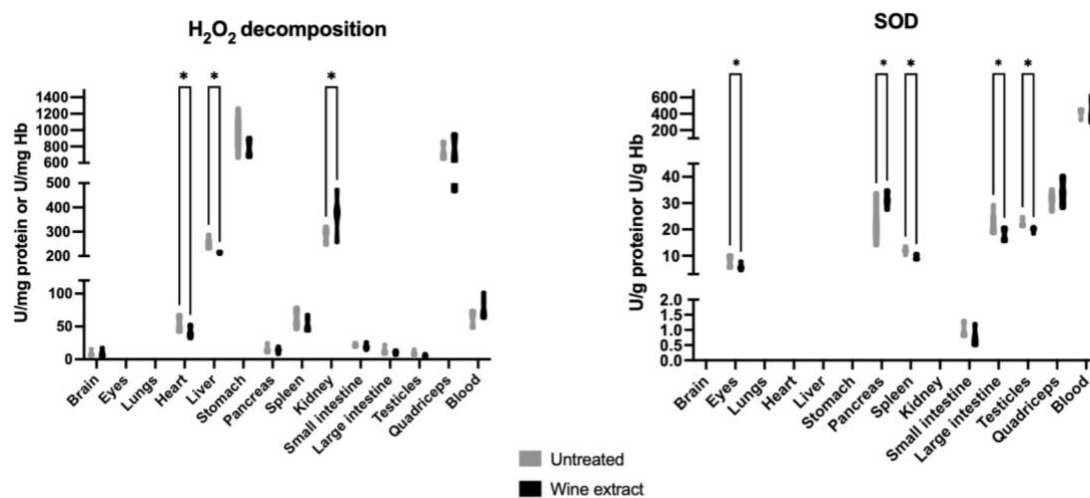
Εικόνα 98: Επιδράσεις του εκχυλίσματος οίνου στα επίπεδα GSH και TAC των ιστών των επίμυων μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. * $p < 0.05$

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως εκφράζεται από τα επίπεδα TBARS, ήταν αυξημένη στους ιστούς του εγκεφάλου, του σπλήνα, των νεφρών και του λεπτού εντέρου επιμύων που έλαβαν το εκχύλισμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, στους πνεύμονες, στο ήπαρ και στους όρχεις παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα TBARS στην ομάδα των ζώων που έλαβαν το εκχύλισμα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών δεν επηρεάστηκε μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος οίνου. Τα αποτελέσματα από τα επίπεδα των TBARS και των CARB παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



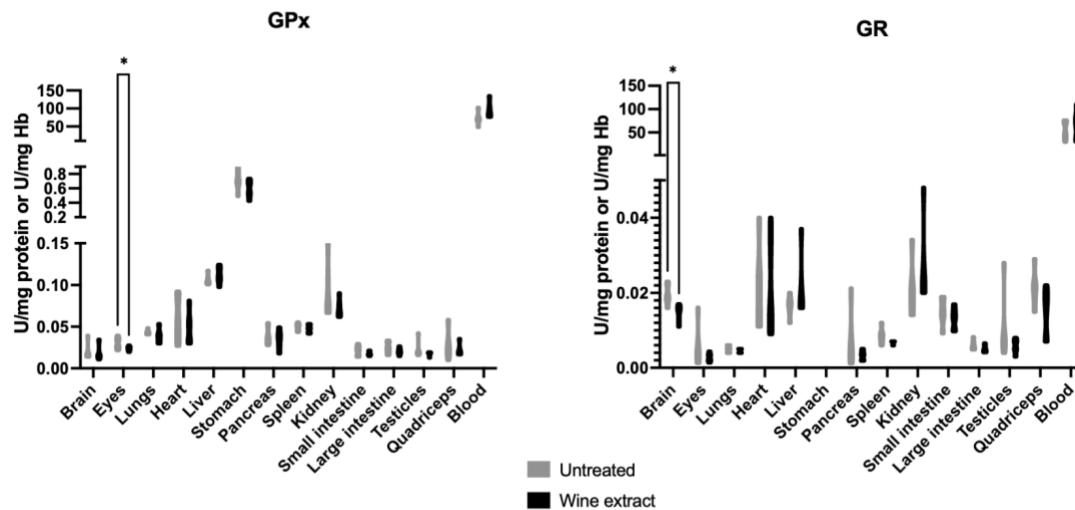
Εικόνα 99: Επιδράσεις του εκχυλίσματος οίνου στα επίπεδα TBARS και CARBS των ιστών των επιμύων μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. * $p < 0.05$

Οι ιστοί της καρδιάς και του ήπατος εμφάνισαν μειωμένο ρυθμό αποικοδόμησης του H_2O_2 , μέσω μείωσης της δραστικότητας του ενζύμου της καταλάσης, ενώ οι ιστοί των νεφρών έδειξαν το ανάποδο αποτέλεσμα μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος οίνου. Η δραστικότητα της SOD ανιχνεύθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα στους ιστούς των ματιών, του σπλήνα, του παχέος εντέρου και των όρχεων, σε αντίθεση με τον ιστό του παγκρέατος όπου η SOD είχε αυξημένη δραστικότητα στην ομάδα που έλαβε το εκχύλισμα του οίνου. Τα αποτελέσματα στη δραστικότητα της καταλάσης και της SOD παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 100: Επιδράσεις του εκχυλίσματος οίνου στη διάσπαση του H_2O_2 και τη δραστηριότητα της SOD στους ιστούς των επίμυων μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. * $p < 0.05$.

Η δραστικότητα της GPx μειώθηκε στον ιστό των ματιών, ενώ η δραστικότητα της GR βρέθηκε μειωμένη στον εγκέφαλο των ζώων που έλαβαν το εκχύλισμα του οίνου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα της δραστικότητας της GPx και της GR παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 101: Επιδράσεις του εκχυλίσματος οίνου στη δραστηριότητα της GPx και της GR των ιστών των επίμυων μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. * $p < 0.05$.

6.4 Συζήτηση

Στο 4^ο επίπεδο αναλύσεων εξετάστηκε ενδελεχώς η επίδραση της από του στόματος χορήγηση εκχυλίσματος ερυθρού οίνου για 14 ημέρες, ποικιλίας Ξινόμαυρο, πλούσιου σε πολυφαινόλες, σε επίμυες. Ο έλεγχος αφορούσε οξειδοαναγωγικούς δείκτες, καθώς επίσης και δεδομένα για την ανάπτυξη τους, τα κλινικά τους χαρακτηριστικά, αιματολογικές αναλύσεις και ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Η δόση που επιλέχθηκε ήταν 25 mg πολυφαινόλης/kg ανά επίμυ ανά ημέρα. Η απόφαση για την δόση αυτή προήλθε από τα αποτελέσματα των αναλύσεων των 3 προηγούμενων επιπέδων αναλύσεων, σε *in vitro* δοκιμές που περιλαμβάνουν κυτταρικά συστήματα (3^ο επίπεδο αναλύσεων) ή απλές εργαστηριακές δοκιμές (1^ο και 2^ο επίπεδο αναλύσεων). Επιπλέον παράγοντας για τον καθορισμό της δόσης ήταν η αντιστοιχία του με μία δόση ισοδύναμη της κατανάλωσης οίνου από τον άνθρωπο καθημερινά. Στην συγκεκριμένη δοκιμή, η αντίστοιχη ποσότητα στον άνθρωπο ήταν μία ημερήσια κατανάλωση 2 ποτηριών κόκκινου οίνου.

Η επιλογή του εκχυλίσματος του Ξινόμαυρου έγινε για ακόμα μία φορά με γνώμονα τα αποτελέσματα που παρουσίασαν τα 4 εκχυλίσματα οίνων στα προηγούμενα επίπεδα αναλύσεων. Πιο αναλυτικά, το Ξινόμαυρο παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα πολυφαινόλων σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, εμφάνισε ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση ενώ ενίσχυσε και την αντιοξειδωτική δράση με ταυτόχρονη μείωση των ROS, TBARS και CARBS στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκε.

Η διάρκεια της μελέτης με τη χορήγηση του εκχυλίσματος του Ξινόμαυρου οίνου ήταν 14 ημέρες. Η επιλογή αυτή έγινε με σκοπό να εξαχθούν πρωταρχικά συμπεράσματα σχετικά με την ασφάλεια του εκχυλίσματος, ώστε να διεξαχθούν στο μέλλον εκτενέστερες μελέτες σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του ΟΟΣΑ. Επιπλέον η καθημερινή κατανάλωση οίνου είναι μία συνήθεια που πιθανόν γίνεται για συνεχόμενα διαστήματα 2 εβδομάδων κυρίως σε περιόδους διακοπών, οπότε τα αποτελέσματα δίνουν και ενδείξεις της καθημερινής κατανάλωσης οίνου για περίοδο 2 εβδομάδων, κάτι που συχνά συμβαίνει σε μεγάλο ποσοστό του ανθρώπινου πληθυσμού.

Περνώντας στα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές μεταξύ της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου και της ομάδας ελέγχου.

Οι ιστοί των επίμυων με τα πιο εμφανή αποτελέσματα ήταν το πάγκρεας, ο σπλήνας, το λεπτό και το παχύ έντερο, οι όρχεις και ο τετρακέφαλος, οι οποίοι παρουσίασαν αξιοσημείωτα αυξημένα επίπεδα GSH μετά την από του στόματος χορήγηση του πολυφαινολικού εκχυλίσματος οίνου. Οι ιστοί των νεφρών και του παχέος εντέρου παρουσίασαν επίσης υψηλά ενδογενή επίπεδα TAC μετά τη δεκατετραήμερη χορήγηση. Η χορήγηση του εκχυλίσματος του Ξινόμαυρου οίνου προστάτευσε επίσης τους πνεύμονες, το ήπαρ, το παχύ έντερο και τους όρχεις από την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αντίθετα, τα μάτια, το στομάχι και οι πνεύμονες παρουσίασαν απορρυθμισμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως προκύπτει από τα χαμηλότερα επίπεδα TAC στους επίμυες που έλαβαν εκχύλισμα οίνου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ακόμα διαπιστώθηκε χαμηλότερη δραστηριότητα GPx στα μάτια της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ο ιστός του εγκεφάλου των επίμυων παρουσίασε επίσης μια οξειδοαναγωγική ανισορροπία που βασίζεται στα υψηλότερα επίπεδα υπεροξειδωσης των λιπιδίων (TBARS) καθώς και στη χαμηλότερη δραστηριότητα GR στους επίμυες που έλαβαν το εκχύλισμα του οίνου. Ο ιστός του σπλήνα ακολουθεί το ίδιο αρνητικό μοτίβο με την εμφάνιση αυξημένων επιπέδων υπεροξειδωσης λιπιδίων και μειωμένης ενζυμικής δραστηριότητας SOD. Ο νεφρός παρουσίασε αυξημένα επίπεδα υπεροξειδωσης λιπιδίων αλλά και αυξημένο ρυθμό διάσπασης του H_2O_2 . Οι παραπάνω οξειδοαναγωγικές μεταβολές στους ιστούς ωστόσο δεν αποτυπώνονται στα αποτελέσματα του αίματος όπου δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή σε κανέναν από τους εξεταζόμενους δείκτες.

Σε προηγούμενες μελέτες, οι νεφροί των επίμυων έδειξαν μειωμένη υπεροξειδωση λιπιδίων και αυξημένη αναλογία GSH/GSSG καθώς και δραστηριότητα των CAT και GPx κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας έκθεσης σε οίνο πλούσιο σε φλαβονόλες για 10 εβδομάδες (Rodrigo et al., 2002). Η φλούδα του σταφυλιού βρέθηκε επίσης να βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα σε επίμυες που τρέφονταν με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, όπως προκύπτει από την αυξημένη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος και τις δραστηριότητες της ηπατικής καταλάσης και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, της οξειδάσης της ξανθίνης και της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (S.-J. Lee et al., 2009). Σε ένα παρόμοιο πειραματικό μοντέλο, το εκχύλισμα φύλλων αμπέλου βρέθηκε επίσης να προκαλεί ευεργετικές επιδράσεις σε αντίστοιχους δείκτες (Yu et al., 2014).

Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση δεν έδειξε σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δύο εξεταζόμενων ομάδων. Τα ευρήματα αυτά είναι παρόμοια με άλλες μελέτες που εξέτασαν πολυφαινόλες από εκχυλίσματα σταφυλιών (σπόροι και φλούδα) (Bentivegna & Whitney, 2002; Erexson, 2003; Inoue et al., 2013; Lluís et al., 2011; J. Shi et al., 2003; Yamakoshi et al., 2002) ή που αξιολόγησαν μόνο την trans-ρεσβερατρόλη (Emília Juan et al., 2002). Η μέχρι τώρα βιβλιογραφία δεν έχει μελετήσει την ασφάλεια της πρόσληψης των μειγμάτων των πολυφαινολών από την κατανάλωση οίνου. Σε τοξικολογική μελέτη 28 ημερών σε επίμυες με καθημερινή από του στόματος χορήγηση μιας πολυφαινόλης που περιέχεται στον οίνο, της trans-ρεσβερατρόλης, σε δόση 20mg/kg, δεν παρουσιάστηκαν ανεπιθύμητες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (Emília Juan et al., 2002). Στην ίδια μελέτη, αρχικά, διεξήχθη δοκιμή οξείας τοξικότητας με τη χορήγηση trans-ρεσβερατρόλης σε δόση 2gr/kg χωρίς την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών στους επίμυες. Επιπλέον, μια μελέτη οξείας τοξικότητας από το στόμα με εκχύλισμα σπόρων και φλούδας σταφυλιού, δίνει ως LD₅₀ συγκέντρωση μεγαλύτερη από 5000mg/kg, ενώ η δοκιμή *in vitro* μεταλλαξιγένεσης έδειξε θετικό αποτέλεσμα (Lluís et al., 2011). Υποχρόνιες μελέτες με εκχύλισμα φλούδας σταφυλιού ή/και εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού βρέθηκαν ασφαλείς (Bentivegna & Whitney, 2002; Inoue et al., 2013; Yamakoshi et al., 2002) με NOAEL που εκτιμήθηκε σε 600mg/kg/d για αρσενικούς αρουραίους (Inoue et al., 2013).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι η από του στόματος χορήγηση πολυφαινολών για διάρκεια 14 ημερών σε δόση 25mg/kg σε επίμυες δεν επηρέασε το τελικό σωματικό βάρος ή το μέσο ρυθμό ανάπτυξής τους. Οι από του στόματος μελέτες της trans-ρεσβερατρόλης (ως συστατικό του οίνου) δείχνουν ότι δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο σωματικό βάρος ή στο μέσο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε αρκετές μελέτες (Carbó et al., 1999; Emília Juan et al., 2002; Turrens et al., 2009). Επίσης, ο Wilson και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι δεν υπήρχε διαφορά στο σωματικό βάρος και στην κατανάλωση τροφής μεταξύ κουνελιών που λάμβαναν μια υπερχοληστερολαιμική δίαιτα που περιείχε trans-ρεσβερατρόλη και των ατόμων ελέγχου (Wilson et al., 1996). Ομοίως, υποχρόνιες μελέτες με εκχυλίσματα από σπόρους και φλούδες σταφυλιών επιβεβαιώνουν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην ανάπτυξη των επίμυων (Inoue et al., 2013; S. Ray et al., 2001). Υποχρόνια μελέτη με χορήγηση ρεσβερατρόλης από το στόμα, λόγω της στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ της σχετιζόμενης με τη δόση μείωσης του βάρους και της αύξησης της

χολερυθρίνης, προκάλεσε NOAEL 200mg/kg/d για τους επίμυες και 600mg/kg/d για τους σκύλους (Johnson et al., 2011). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να ενισχύσουν τα ευρήματα της παρούσας διατριβής ότι το εκχύλισμα πολυφαινολών από ερυθρό οίνο δεν παρουσιάζει αλλαγές στην ανάπτυξη και είναι καλά ανεκτό από τα ζώα στη δόση και την οδό χορήγησης που εξετάστηκε. Τόσο στην παρούσα μελέτη, όσο και σε άλλες μελέτες που διεξήχθησαν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα με εκχυλίσματα από επιμέρους μέρη των σταφυλιών δεν παρατηρήθηκαν κλινικά ευρήματα κατά τη διάρκεια της χορήγησής τους (Bentivegna & Whitney, 2002; Inoue et al., 2013; Lluís et al., 2011; S. Ray et al., 2001; Wren et al., 2002; Yamakoshi et al., 2002).

Οι αιματολογικές εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων και ήταν εντός των τιμών αναφοράς που προτείνονται για τη φυλή, το φύλο και την ηλικία των εξεταζόμενων ζώων (Jacob Filho et al., 2018).

σον αφορά τους δείκτες από τις βιοχημικές αναλύσεις, τα επίπεδα ALT και ALP, τα οποία υποδηλώνουν ηπατική βλάβη, δεν διέφεραν μεταξύ των ομάδων. Οι τιμές των παραμέτρων που καθορίζουν τη νεφρική λειτουργία (ουρία και κρεατινίνη) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα του Ξινόμαυρου οίνου και της ομάδας ελέγχου και ήταν και αυτές εντός των τιμών αναφοράς. Τα παραπάνω ευρήματα είναι παρόμοια με μελέτες στις οποίες χορηγήθηκε μία μόνο πολυφαινόλη ή εκχυλίσματα από μεμονωμένα μέρη σταφυλιών (Bentivegna & Whitney, 2002; Emilia Juan et al., 2002; Inoue et al., 2013; Lluís et al., 2011; S. Ray et al., 2001; Wren et al., 2002; Yamakoshi et al., 2002).

Η εξέταση των ζωτικών οργάνων κατά την νεκροψία δεν αποκάλυψε αλλαγές μεταξύ των 2 ομάδων των ζώων και πιο συγκεκριμένα δεν παρατηρήθηκε τίποτα μη φυσιολογικό σε κανένα από τα 12 ζώα που εξετάστηκαν. Κατά την ιστολογική εξέταση, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στους ιστούς που ελήφθησαν από τους πνεύμονες, αλλά αυτό παρατηρήθηκε και στις δύο πειραματικές ομάδες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη νεκροψία δεν υπήρξαν εμφανείς αλλαγές στο μέγεθος, το χρώμα, την υφή ή/και τη σύνθεση των πνευμόνων. Οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν χαρακτηρίζονταν από αύξηση των περιαγγειακών μονοπύρηνων κυττάρων (κυρίως λεμφοκύτταρα), που εντοπίστηκαν γύρω από τις μεσαίου μεγέθους αρτηρίες σε όλους τους πνεύμονες και μερικές φορές επεκτείνονταν στις περιβρογχιολικές περιοχές. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν εστιακές διηθήσεις μικτών φλεγμονωδών κυττάρων

(μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ενίοτε ουδετερόφιλα) στο διάμεσο διάστημα και στις κυψελίδες. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε ωστόσο καμία διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων όσον αφορά την εμφάνιση αλλά και την ένταση των αλλοιώσεων. Η κυρίαρχη παρουσία των λεμφοκυττάρων στην περιοχή παραπέμπει σε χρόνια φλεγμονή. Τα παραπάνω δεδομένα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η φλεγμονή προϋπήρχε της έναρξης του πειράματος και δεν σχετίζεται με τη χορήγηση του εκχυλίσματος οίνου. Στην ενίσχυση του παραπάνω συμπεράσματος οδηγούν και βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι παρόμοιες αλλοιώσεις στους πνεύμονες είναι συχνές στα πειραματόζωα, σε ποσοστό τουλάχιστον 50%, και μπορεί να οφείλονται σε διάφορους λοιμώδεις παράγοντες (Albers et al., 2009; Baker, 1998). Επιπλέον, αναφέρεται ότι παρόλο που οι προμηθευτές των πειραματόζωων εγγυώνται την απουσία παθογόνων μικροοργανισμών, παρόμοιες αλλοιώσεις στους πνεύμονες των πειραματόζωων, και επίμυων συγκεκριμένα, αποκαλύπτονται κατά τη δειγματοληπτική εξέταση πριν από τον πειραματισμό, οι οποίες τείνουν να περιορίζονται καθώς οι αρουραίοι ωριμάζουν σε ηλικία (Elwell et al., 1997; Slaoui et al., 1998). Οι αρουραίοι ηλικίας ενός έτους είναι ως επί το πλείστον απαλλαγμένοι από αλλοιώσεις. Η αυξημένη παρουσία των παραπάνω αλλοιώσεων κατά τις πρώτες εβδομάδες ζωής οφείλεται πιθανώς στο ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα των επίμυων, το οποίο καθώς ωριμάζει, οδηγεί σε προοδευτική μείωση των παρατηρούμενων αλλοιώσεων. Κατά την ιστολογική εξέταση δεν βρέθηκαν επίσης λοιμογόνοι παράγοντες.

Σε μια μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας 13 εβδομάδων με επίμυες που έλαβαν εκχύλισμα φλούδας σταφυλιού, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στους παρωτιδικούς αδένες και στους νεφρούς, με μια NOAEL δόση 600mg/kg για τα αρσενικά (Inoue et al., 2013), ενώ μια άλλη υποχρόνια μελέτη με επίμυες που έλαβαν εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού δεν αναφέρει καμία αλλαγή και η NOAEL δόση ορίστηκε στα 1410 mg/kg/d για τους αρσενικούς αρουραίους (Yamakoshi et al., 2002). Μια υποχρόνια μελέτη διάρκειας 3 μηνών με επίμυες που υποβλήθηκαν σε από του στόματος χορήγηση εκχυλίσματος σπόρων και φλούδας σταφυλιού, προσδιορίζει τη δόση NOAEL στα 1780 mg/kg/d σε αρσενικά ζώα (Bentivegna & Whitney, 2002). Με βάση τα ιστοπαθολογικά δεδομένα των παραπάνω μελετών και τις δόσεις NOAEL για τα εκχυλίσματα από τα μέρη των καρπών των σταφυλιών που έχουν καθοριστεί σε πολλές μελέτες, η δόση των 25mg/kg/d πολυφαινολών που χρησιμοποιήθηκε για την

εκπόνηση της παρούσας μελέτης, από το χορηγούμενο εκχυλίσμα οίνου φαίνεται να είναι αρκετά χαμηλή ώστε να εμφανιστούν αλλοιώσεις σε ζωτικά όργανα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν νέες, σημαντικές γνώσεις σχετικά με τη βιολογική δραστηριότητα του πολυφαινολικού εκχυλίσματος του οίνου της ποικιλίας Ξινόμαυρο. Το δείγμα αυτό, που χορηγήθηκε σε πειραματόζωα για 14 μέρες σε συγκέντρωση ανάλογη με την κατανάλωση 2 ποτηριών ημερησίως από τον άνθρωπο προκάλεσε οξειδοαναγωγικές προσαρμογές στα ζώα που τους χορηγήθηκε. Η απουσία αρνητικών επιδράσεων στην ανάπτυξη, η απουσία συμπτωμάτων, οι φυσιολογικές τιμές στις αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις, η φυσιολογική εμφάνιση των ζωτικών οργάνων κατά την νεκροψία και η απουσία ιστοπαθολογικών δυσμενών ευρημάτων που σχετίζονται με την κατανάλωση εκχυλίσματος, υποδηλώνουν ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος κόκκινου οίνου της ποικιλίας Ξινόμαυρο, πλούσιου σε πολυφαινόλες, είναι ασφαλής υπό τις συνθήκες δοκιμής. Ωστόσο, απαιτούνται εκτενέστερες τοξικολογικές μελέτες, σύμφωνα με τις οδηγίες του ΟΟΣΑ, για την περαιτέρω τεκμηρίωση της ασφάλειας των εκχυλισμάτων κόκκινου οίνου που προέρχονται είτε από τα σταφύλια είτε από τον ίδιο τον οίνο και για τον προσδιορισμό μιας δόσης NOAEL.

Εν κατακλείδι, η μελέτη που σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε είναι μια μοναδική για τις Ελληνικές ποικιλίες μελέτη, αποδεικνύοντας για πρώτη φορά την βιοδραστικότητα ενός εκχυλίσματος σε *in vivo* σύστημα (Tekos et al., 2023). Τα αποτελέσματα αυτά, αποτελούν βασική πηγή έρευνας για νέες μελέτες, πιο στοχευμένες, μεγαλύτερης διάρκειας, και ενδεχομένως με χορήγηση μεμονωμένων πολυφαινολών ή και μείγματα αυτών για τον εντοπισμό συγκεκριμένων μορίων με συγκεκριμένες δράσεις.

7 Συνολική συζήτηση

Στη διδακτορική αυτή διατριβή έγινε μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων γηγενών ποικιλιών οίνου, σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα με την χρήση μοριακών τεχνικών. Η μελέτη ξεκίνησε με βιβλιογραφική ανασκόπηση και αξιολόγηση της δυναμικότητας των ελληνικών οίνων όσον αφορά την παραγωγή, την παράδοση, την ελληνικότητα και τις εξαγωγές των διαφόρων ποικιλιών. Η έρευνα αυτή κατέληξε σε 4 ποικιλίες, οι οποίες αξιολογήθηκαν κατά την πορεία της έρευνας.

Οι 4 Ελληνικές ποικιλίες οίνων που αξιολογήθηκαν ήταν οι ερυθρές Ξινόμαυρο και Αγιωργίτικο και οι λευκές Ασύρτικο και Μαλαγουζιά. Για κάθε μια από τις 4 ποικιλίες έγινε προμήθεια 8 οίνων οπότε και συγκεντρώθηκαν 32 φιάλες. Η γεωγραφική προέλευση των οίνων έγινε προσπάθεια να καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της χώρας. Ενδεικτικά, δείγματα προέρχονταν από τη Μακεδονία, τη Θεσσαλία, τη Στερεά Ελλάδα και την Αττική, την Πελοπόννησο και τα νησιά του Αιγαίου Πελάγους.

Το 1^ο επίπεδο αναλύσεων πραγματοποιήθηκε στους 32 οίνους και περιλάμβανε μία σειρά από *in vitro* δοκιμές για τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου και την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων. Για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων έγινε χρήση βιοχημικών πρωτοκόλλων για τον έλεγχο της ικανότητας των δειγμάτων να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες καθώς και να προστατεύουν το DNA από θραύσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα και των 4 ποικιλιών, τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών εμφάνισαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Οι ερυθρές ποικιλίες εμφάνισαν μεγαλύτερη βιοδραστικότητα σε όλες τις μεθόδους που αξιολογήθηκαν σε σχέση με τις λευκές. Σημαντικό εύρημα είναι η δραστικότητα των δειγμάτων από την ποικιλία του Ασύρτικου οίνου καθώς παρουσίασαν στατιστικά πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα από τα δείγματα της ποικιλίας της Μαλαγουζιά, σε αντίθεση με τα 16 δείγματα από τους ερυθρούς οίνους που παρουσίασαν όμοια δραστικότητα σε όλες τις μεθόδους με ένα μικρό προβάδισμα στη δραστικότητα από τα δείγματα του Ξινόμαυρου. Επιπλέον σε μία μέθοδο, την ικανότητα εξουδετέρωσης της τεχνητής ρίζας ABTS⁺, το Ασύρτικο είχε παρόμοια δραστικότητα με τους ερυθρούς οίνους και μάλιστα ο μέσος όρος των IC50 ήταν λίγο χαμηλότερος από τον αντίστοιχο μέσο όρο της ποικιλίας Αγιωργίτικο.

Η κύρια διαφορά μεταξύ λευκού και κόκκινου οίνου έχει να κάνει με το χρώμα των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται καθώς και με το εάν ο χυμός των σταφυλιών

ζυμώνεται με ή χωρίς τη φλούδα των σταφυλιών και τα κουκούτσια. Για την παρασκευή λευκού οίνου, τα σταφύλια πιέζονται και οι φλούδες, τα κουκούτσια και τα κοτσάνια αφαιρούνται πριν από τη ζύμωση. Αντίθετα, για την παρασκευή ερυθρού οίνου, τα συμπιεσμένα κόκκινα σταφύλια μεταφέρονται απευθείας σε δεξαμενές και ζυμώνονται μαζί με τη φλούδα, τα κουκούτσια και τα κοτσάνια. Οι φλούδες των σταφυλιών προσδίδουν στον οίνο τη χρωστική του, καθώς και πολλές από τις χαρακτηριστικές ενώσεις που δίνουν τα αρώματα, την υφή και φυσικά τις ευεργετικές, για την υγεία, ιδιότητες. Ως αποτέλεσμα της ζύμωσης με τις φλούδες των σταφυλιών, ο ερυθρός οίνος είναι ιδιαίτερα πλούσιος σε φυτικές ενώσεις που υπάρχουν σε αυτές, όπως οι ταννίνες και η ρεσβερατρόλη (Chung et al., 1998). Ο λευκός οίνος έχει επίσης κάποιες από αυτές τις φυτικές ενώσεις, αλλά γενικά σε πολύ μικρότερες ποσότητες (Lukić et al., 2015). Αυτός είναι και ο βασικός λόγος για την υπεροχή των ερυθρών ποικιλιών στην πολυφαινολική σύσταση και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε μία σειρά μελετών στους λευκούς οίνους που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της επίδρασης, της επαφής με την φλούδα στην αντιοξειδωτική, φαινολική σύνθεση και τις οργανοληπτικές ιδιότητες φάνηκε ότι η επαφή με την φλούδα αύξησε τα επίπεδα των φαινολικών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με βιολογικές, βιοδραστικές ιδιότητες, και βελτίωσε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου. Οι τιμές της ρεσβερατρόλης και των γλυκοζιτικών ισομερών της ήταν οι υψηλότερες που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα σε λευκό οίνο (Darias-Martín et al., 2000; Gómez-Míguez et al., 2007; Selli et al., 2003).

σον αφορά τις ευεργετικές για την υγεία επιδράσεις, ο ερυθρός οίνος είναι το βασικό στοιχείο πίσω από το γαλλικό παράδοξο (Vidavalur et al., 2006). Σύμφωνα με αυτό, στη Γαλλία υπάρχουν σχετικά λίγες καρδιακές παθήσεις, παρά την παράδοση της διατροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά. Παρά το υψηλό επίπεδο παραγόντων κινδύνου, όπως η χοληστερόλη, ο διαβήτης, η υπέρταση και η υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών, οι Γάλλοι εμφανίζουν το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από ισχαιμική καρδιοπάθεια και καρδιαγγειακά νοσήματα στις δυτικές βιομηχανικές χώρες (36% χαμηλότερο από τις ΗΠΑ και 39% χαμηλότερο από το Ηνωμένο Βασίλειο). Αντίθετα, η θνησιμότητα από άλλες αιτίες είναι μόνο 8% χαμηλότερη από ό,τι στις ΗΠΑ και 6% από ό,τι στο Ηνωμένο Βασίλειο, λόγω του υψηλού επιπέδου θανάτων από καρκίνο και βίαιους θανάτους. Σε μια πρόσφατη μελέτη που συμμετείχαν 34.000 μεσήλικες άνδρες από την Ανατολική Γαλλία με

παρακολούθηση 12 ετών παρατηρήθηκε ότι για 48 γραμμάρια αλκοόλ (κυρίως οίνο) την ημέρα ως μέση πρόσληψη, η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν χαμηλότερη κατά 30%, η θνησιμότητα από άλλες αιτίες μειώθηκε κατά 20%, αλλά η θνησιμότητα από καρκίνο και βίαιους θανάτους ήταν αυξημένη σε σύγκριση με την ομάδα που δεν κατανάλωνε αλκοόλ. Έτσι, το λεγόμενο «γαλλικό παράδοξο» (χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας ειδικά από καρδιαγγειακά νοσήματα) μπορεί να οφείλεται κυρίως στην τακτική κατανάλωση οίνου (Burr, 1995; Renaud & de Lorgeril, 1992b; Renaud & Gueguen, 1998).

Επιπλέον μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η κατανάλωση ερυθρού οίνου μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα (Mohamed Saleem & Basha, 2010; Mombouli & Vanhoutte, 1999). Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν σήμερα ένα μείζον πρόβλημα που προκαλεί θνησιμότητα τόσο στις δυτικές όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Το οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με την αθηροσκλήρωση και την ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειακή φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των CVD. Ο ερυθρός οίνος περιέχει αντιοξειδωτικά συστατικά όπως η ρεσβερατρόλη, η προανθοκυανιδίνη, η κερκετίνη κ.λπ. Αυτά τα ενεργά συστατικά ασκούν προστατευτικές λειτουργίες όπως η δράση αδρανοποίησης των ελεύθερων ριζών, η μείωση του οξειδωτικού στρες και η μείωση της φλεγμονώδους αθηρωματικής βλάβης τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο (Bonnefont-Rousselot, 2016). Από αυτά τα ευρήματα, συνεπάγεται το συμπέρασμα ότι ο ερυθρός οίνος ως συμπλήρωμα διατροφής μπορεί να είναι ευεργετικό για τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου (da Luz & Coimbra, 2004; J. M. Wu et al., 2001; J. M. Wu & Hsieh, 2011). Ακόμα η υπεύθυνη κατανάλωση οίνου μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση της "καλής" HDL χοληστερόλης η οποία συνδέεται με χαμηλότερα ποσοστά καρδιακών παθήσεων. Μια μελέτη διαπίστωσε ότι οι ενήλικες στους οποίους έδωσαν 1-2 ποτήρια ερυθρό οίνο καθημερινά για τέσσερις εβδομάδες είδαν αύξηση 11-16% στα επίπεδα της HDL, σε σύγκριση με εκείνους που έπιναν απλώς νερό ή νερό και εκχύλισμα σταφυλιού (Blalock et al., 2022; Hansen et al., 2005). Μια σημαντική επιδημιολογική μελέτη στην Ελλάδα με τίτλο «ATTICA» είχε ως στόχο να αξιολογηθεί η συσχέτιση μεταξύ της χρόνιας κατανάλωσης αλκοόλ και διαφόρων κλινικών και βιοχημικών παραμέτρων που σχετίζονται με τον στεφανιαίο κίνδυνο, σε άνδρες και γυναίκες που δεν πάσχουν από καρδιαγγειακή νόσο. Στη μελέτη συμμετείχαν τυχαία 750 άνδρες και 883 γυναίκες (18-88 ετών) από την ευρύτερη

περιοχή της Αθήνας, κατά τη διάρκεια του 2001-2002. Διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και της αρτηριακής πίεσης, των επιπέδων ινωδογόνου, της συγκέντρωσης γλυκόζης, της ολικής χοληστερόλης, της HDL και της LDL, της απολιποπρωτεΐνης A1 και B, του ουρικού οξέος, του αριθμού των λευκοκυττάρων, των τριγλυκεριδίων, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και των επιπέδων ομοκυστεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια συσχέτιση σχήματος J μεταξύ της πρόσληψης αλκοόλ (καθόλου, 1-2, 3-4, 5 + ποτήρια οίνου/ημέρα) και του ουρικού οξέος, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, της ομοκυστεΐνης, του ινωδογόνου, των τριγλυκεριδίων, των απολιποπρωτεϊνών A1 και B, της HDL και της ολικής χοληστερόλης, των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, του αριθμού των λευκοκυττάρων και των επιπέδων αρτηριακής πίεσης (μόνο στους άνδρες). Οι πιο ευεργετικές τιμές όλων αυτών των βιοχημικών και κλινικών παραμέτρων βρέθηκαν σε κατανάλωση αλκοόλ 100-200 ml (12% αλκοόλ) δηλαδή μίας υπεύθυνης κατανάλωσης ενός με δύο ποτηριών ανά ημέρα (Chrysohoou et al., 2003).

Μια επιπλέον ευεργετική επίδραση του οίνου είναι η προστασία από νευροεκφυλιστικές ασθένειες και από την προστασία κατά της παραγωγής των β-αμυλοειδών (Corona et al., 2013; Granzotto & Zatta, 2014a; Panza et al., 2012). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η μέτρια κατανάλωση ερυθρού οίνου μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ (AD) (Granzotto & Zatta, 2014b; J. Wang et al., 2006). Χρησιμοποιώντας ποντίκια Tg2576, τα οποία μοντελοποιούν τη νευροπαθολογία της αμυλοειδούς βήτα-πρωτεΐνης (Abeta), εξετάστηκε αν η μέτρια κατανάλωση του ερυθρού οίνου Cabernet Sauvignon διαμορφώνει τη νευροπαθολογία τύπου AD και τη γνωστική επιδείνωση. Διαπιστώθηκε ότι το Cabernet Sauvignon μετρίασε σημαντικά την επιδείνωση ασθένειας AD σε ποντίκια Tg2576 σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου που έλαβαν είτε αντίστοιχη ποσότητα αιθανόλης είτε μόνο νερό. Η χημική ανάλυση έδειξε ότι το Cabernet Sauvignon που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη περιέχει πολύ χαμηλή περιεκτικότητα ρεσβερατρόλης (0,2 mg/L), συγκέντρωση 10 φορές χαμηλότερη από την ελάχιστη αποτελεσματική συγκέντρωση που έχει αποδειχθεί ότι προάγει την απομάκρυνση της Abeta *in vitro*. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το Cabernet Sauvignon ασκεί ευεργετική επίδραση προάγοντας τη μη αμυλοειδογόνο επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς, η οποία τελικά αποτρέπει τη δημιουργία πεπτιδίων Abeta. Η μελέτη αυτή υποστηρίζει επιδημιολογικά στοιχεία που δείχνουν ότι η μέτρια κατανάλωση οίνου, εντός του εύρους που συνιστούν

οι διατροφικές οδηγίες του FDA, δηλαδή ένα ποτό την ημέρα για τις γυναίκες και δύο για τους άνδρες, μπορεί να συμβάλει στη μείωση του σχετικού κινδύνου για την εμφάνιση AD (J. Wang et al., 2006). Τέτοιου είδους μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν και για τα Ελληνικά κρασιά ώστε να αποδειχθεί η ευεργετική τους δράση ενάντια στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Μελέτες που έγιναν αποκλειστικά με την δραστική ουσία ρεσβερατρόλη έχουν αποδείξει ότι η ένωση αυτή μπορεί να μειώσει τον πόνο στις αρθρώσεις, μειώνοντας την καταστροφή του χόνδρου των οστών (Elmali et al., 2005, 2007). Ακόμα, η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες ότι αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και επομένως μπορεί να βοηθήσει στη θεραπεία του διαβήτη (C. C. Chang et al., 2011; Frojdo et al., 2008; Mobasheri et al., 2012; Sharma et al., 2006; Soleas et al., 2002b; Vallianou et al., 2013). Πολύ σημαντική είναι και η δράση της ρεσβερατρόλης ως μιμητικό μόριο του θερμιδικού περιορισμού και της νηστείας. Ως μόριο που μιμείται τον θερμιδικό περιορισμό και την νηστεία μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα αλλά και τη διάρκεια της ζωής του του ανθρώπου, καθυστερώντας την εξέλιξη ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία και το γήρας. Μελέτες σε ζύμες εντόπισαν τον ρυθμιστή σιωπηλής πληροφορίας 2 (Sir2), ο οποίος είναι μια NAD⁺-εξαρτώμενη αποακετυλάση. Τα ομόλογα του Sir2 στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αναφέρονται ως σιρτουίνες. Η SIRT1, η σιρτουίνη που έχει τη στενότερη συγγένεια με τη Sir2, είναι μία από τις επτά σιρτουίνες στα θηλαστικά. Οι ευεργετικές επιδράσεις του περιορισμού των θερμίδων και της νηστείας αφορούν τη λειτουργία της SIRT1, η οποία επάγεται από τον περιορισμό των θερμίδων σε διάφορους ιστούς. Η σημασία του SIRT1 στις επιδράσεις του θερμιδικού περιορισμού έχει αποδειχθεί με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων ποντικών. Οι Bordone et al. ανέφεραν ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια με SIRT1 παρουσίασαν φαινότυπο παρόμοιο με τον περιορισμό θερμίδων και της νηστείας, με μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, λιποκινών, ινσουλίνης και γλυκόζης και μεγαλύτερη ανοχή στη γλυκόζη σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου (Bordone et al., 2007; Howitz et al., 2003; Hubbard et al., 2013; Imai, 2007). Η δυνατότητα της ρεσβερατρόλης και πιθανόν και άλλων μορίων των οίνων να δρουν ως μόρια που μιμούνται τη νηστεία είναι ιδιαίτερα σημαντική και θα μπορούσε να βοηθήσει σε πολλές μεταβολικές ασθένειες αλλά και στην ευζωία και μακροζωία αυτών που ακολουθούν ένα μοντέλο με διαλειμματική νηστεία και διατροφή που περιέχει μόρια και ενώσεις που μιμούνται το θερμιδικό περιορισμό και την νηστεία (de

Toledo et al., 2020; Grundler et al., 2020; Kerasioti et al., 2013, 2019; KYRIAZIS et al., 2022; Margină, Ungurianu, Purdel, Nițulescu, et al., 2020b; Margină, Ungurianu, Purdel, Tsoukalas, et al., 2020; Ravanidis et al., 2021). Τέλος σε πολλές μελέτες έχει καταγραφεί η δυνατότητα της ρεσβερατρόλης να προλαμβάνει τον καρκίνο (Aluyen et al., 2012; Baur & Sinclair, 2006; Ji et al., 2015; Kim et al., 2016; G. A. Lee et al., 2016; J. Li et al., 2014; Soleas et al., 2002c; H. Wang et al., 2013; J. Zhao et al., 1999).

Σημαντικό στοιχείο στην ποιότητα και την επιλογή ενός οίνου από τους καταναλωτές αποτελεί πολλές φορές και οι παλαιότητα του. Πολλές μελέτες εξετάζουν την επίδραση της παλαίωσης στην αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς και διάφορες οργανοληπτικές παραμέτρους των οίνων. Η επίδραση της παλαίωσης στην βιοδραστικότητά τους αποτέλεσε ένα σημαντικό ερώτημα που δημιουργήθηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και για τον λόγο αυτό σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε ένα παράλληλο πείραμα που περιγράφεται στο παράρτημα στο κεφάλαιο 9.9. Στο πείραμα ελέγχθηκε η δραστητικότητα Μαυροδάφνης από διάφορες περιόδους με την παλαιότερη που αξιολογήθηκε να είναι 130 χρόνια σε βαρέλι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παλαίωση μειώνει κάπως την αντιοξειδωτική ισχύ αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό ενώ σημαντικό ρόλο πιθανόν παίζει η αρχική πρώτη ύλη και η διαδικασία της οινοποίησης.

Συνεχίζοντας τις αναλύσεις στους οίνους, επιλέχθηκε το πιο βιοδραστικό δείγμα κάθε ποικιλίας από της 4 εξεταζόμενες και δημιουργήθηκε το αντίστοιχο πολυφαινολικό εκχύλισμα. Τα 4 νέα δείγματα ένα για την ποικιλία Ξινόμαυρο, ένα για την ποικιλία Αγιωργίτικο, ένα για την ποικιλία Ασύρτικο και ένα για την ποικιλία Μαλαγουζιά, αξιολογήθηκαν εκ νέου για την πολυφαινολική, αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους. Επιπλέον τα 4 εκχυλίσματα χορηγήθηκαν σε 3 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές με σκοπό να διερευνηθεί η δράση τους στο αντιοξειδωτικό σύστημα βιολογικών συστημάτων καθώς και η προστασία από την λιπιδική υπεροξειδωση και καρβονυλίωση των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα από τις παραπάνω αναλύσεις αποτέλεσαν το 2^ο και 3^ο επίπεδο ελέγχου και προσέφεραν σημαντικές πληροφορίες για την δράση των εκχυλισμάτων των Ελληνικών οίνων. Αρχικά επιβεβαιώθηκε η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών ποικιλιών ενώ η ανώτερη βιοδραστική ικανότητα των ερυθρών οίνων που παρατηρήθηκε και στο 1^ο επίπεδο αναλύσεων καταγράφηκε και σε αυτές τις δοκιμές.

Μάλιστα η μείωση των ROS και η αύξηση της GSH που παρατηρήθηκε, επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που αξιολόγησαν εκχύλισμα οίνου ποικιλίας Merlot. Πιο συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις κερκετίνη, κατεχίνη, επικατεχίνη, τυροσόλη, γαλλικό οξύ και προκυανιδίνες οι οποίες συσχετίστηκαν με τη μετρίαση της παραγωγής ROS καθώς και τη μείωση του δείκτη οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης ($RI = GSSG/GSH + GSSG$). Επιπλέον, ορισμένες πολυφαινόλες προκάλεσαν την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων και την έκφραση των πρωτεϊνών ενώ η κερκετίνη φάνηκε να έχει τον πιο βιοδραστικό χαρακτήρα. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τις ευεργετικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων ερυθρού οίνου και ορισμένων πολυφαινολών του σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό αυτό συμπληρωματικά για την θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την οξειδοαναγωγική ισορροπία (Martín et al., 2011, 2013).

Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα στην διδακτορική διατριβή είναι το γεγονός ότι η λευκή ποικιλία Ασύρτικο στις περισσότερες μεθόδους είχε παρόμοια δράση με τις 2 ερυθρές Ξινόμαυρο και Αγιωργίτικο. Μάλιστα τα δεδομένα από την ανάλυση της ικανότητας εξουδετέρωσης της φυσικής ρίζας Superoxide radical, αποκάλυψαν ότι το εκχύλισμα της ποικιλίας Ασύρτικο είναι πιο δραστικό, στατιστικά σημαντικά, ακόμα και από τις ερυθρές ποικιλίες. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με την βιβλιογραφία όπου γενικά κατατάσσει την βιοδραστικότητα των λευκών οίνων αρκετά πιο χαμηλά από αυτή των ερυθρών (Saiko et al., 2008; Waterhouse, 2002). Για την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των λευκών οίνων μπορεί να γίνει προσθήκη ταννινών. Οι οινολογικές ταννίνες αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στο SO_2 για τον έλεγχο της οξείδωσης κατά την οινοποίηση. Ένας σημαντικός λόγος αντικατάστασης του SO_2 είναι η αλλεργική αντίδραση που προκαλεί σε ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού. Η συνολική αξιολόγηση της προσθήκης ταννίνης που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, οδήγησε στη διάκριση των οίνων, σύμφωνα με παραμέτρους φωτομετρικής, χρωματικής και οργανοληπτικής ανάλυσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη ταννίνης οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής δράσης, σε σύγκριση με τους οίνους ελέγχου και τους οίνους με προσθήκη θείου, διατηρώντας παράλληλα τις οργανοληπτικές παραμέτρους του οίνου της Μαλαγουζιάς όπου και δοκιμάστηκε (Strati et al., 2021).

Καθώς η αγγειοδιασταλτική δράση και η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες του εμπορικά διαθέσιμου λευκού οίνου είναι χαμηλή σε σύγκριση με τους ερυθρούς οίνους μία άλλη μελέτη προσπάθησε να αξιολογήσει τις διαφορετικές διαδικασίες ζύμωσης του λευκού οίνου και την επίδραση αυτών στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του τελικού προϊόντος (Mihaljević et al., 2022). Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε το αγγειοδιασταλτικό δυναμικό των λευκών οίνων που παράγονται με τέσσερις διαφορετικές διαδικασίες ζύμωσης: (1) λευκός οίνος που παράγεται με την τυπική διαδικασία, (2) σταφύλια που αφήνονται να εκχυλιστούν πλήρως για 30 ημέρες, (3) σταφύλια που αφήνονται να εκχυλιστούν μέχρι το ήμισυ του αζύμωτου σακχάρου και (4) οίνος που παράγεται με ψύξη του γλεύκους. Τα εξεταζόμενα δείγματα οίνου αναλύθηκαν για την περιεκτικότητά τους σε φαινόλες, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και την περιεκτικότητά τους σε αιθανόλη. Η αγγειοδιαστολή εξετάστηκε στις προσυγκεντρωμένες, με νορεπινεφρίνη, απομονωμένες αορτές αρσενικών Sprague-Dawley επίμυων που εκτέθηκαν τυχαία σε αθροιστικές συγκεντρώσεις (0,1‰ έως 8‰ τελικές αραιώσεις σε λουτρά οργάνων) καθενός από τα εξεταζόμενα δείγματα οίνου με ή χωρίς προσθήκη κερκετίνης ή/και γαλλικού οξέος, απουσία/παρουσία του αναστολέα NOS L-NAME. Η τυπική διαδικασία και η διαδικασία που περιλαμβάνει την ψύξη του γλεύκους παράγει οίνο με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινόλες, αντιοξειδωτική ικανότητα και χαμηλότερο αγγειοδιασταλτικό δυναμικό, αντίστοιχα. Η L-NAME ανέστειλε την αγγειοδιαστολή σε όλα τα δείγματα οίνου ενώ η κερκετίνη με ή χωρίς συμπλήρωμα γαλλικού οξέος αποκατέστησε την αγγειοδιαστολή σε όλα τα δείγματα. Τα αποτελέσματα καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η αγγειοδιαστολή στον λευκό οίνο εξαρτάται από το NO και υποδηλώνει τη δυνατότητα αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του αγγειοδιασταλτικού δυναμικού του λευκού οίνου χρησιμοποιώντας διαφορετικές διαδικασίες παραγωγής, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε κερκετίνη. Με τις παραπάνω προσπάθειες ερευνητών είναι φανερό ότι στο άμεσο μέλλον μπορούν να παραχθούν λευκοί οίνοι με εξαιρετική φαινολική σύσταση και μεγάλη αντιοξειδωτική δράση, ικανοί να συγκριθούν με τους καλύτερης ποιότητας ερυθρούς. Για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρώτη ύλη, μούστος, από «δυνατές» λευκές ποικιλίες όπως το Ασύρτικο και οι οποίες θα οινοποιηθούν με συνδυασμό των παραπάνω νέων τεχνικών (Mihaljević et al., 2022; Nardini & Garaguso, 2018; Romanet et al., 2021; Strati et al., 2021).

Είτε πρόκειται για λευκή είτε για ερυθρή η διαδικασία της οينوποίησης παράγει μεγάλες ποσότητες στερεών οργανικών αποβλήτων που αποτελούνται κυρίως από σάκχαρα, πολυφαινόλες, λιπίδια, ταννίνες και άλλες ενώσεις με πιθανή βιολογική δράση. Στην Ελλάδα τα οينوποιεία διαχειρίζονται περί τους 600.000 τόνους σταφυλιών. Από αυτά περίπου το 15% του βάρους είναι στερεά οργανικά απόβλητα τα οποία πρέπει να διαχειριστούν κατάλληλα. Ωστόσο τα περισσότερα από τα Ελληνικά οينوποιεία είναι μικρές ή μικρομεσαίες επιχειρήσεις, με έδρα σε μικρές ή μεγάλες πόλεις της επαρχίας και των νησιών που αδυνατούν να διαχειριστούν τα απόβλητα με τρόπο που να προστατεύει το περιβάλλον, και εναποτίθενται στην ύπαιθρο, σε ποτάμια και θάλασσες προκαλώντας σοβαρή ρύπανση και μόλυνση για τα γύρω οικοσυστήματα. Τα απόβλητα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αφού πρώτα μετατραπούν σε εκχυλίσματα σε διάφορες βιομηχανίες ως πρόσθετα. Για παράδειγμα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία ζωοτροφών για την παραγωγή τροφής, εμπλουτισμένης με το πολυφαινολικό και αντιοξειδωτικό αυτό εκχύλισμα. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει την ευεργετική δράση τέτοιων εκχυλισμάτων στην υγεία των ζώων όπως σε αρνιά, πρόβατα, κοτόπουλα κρεοπαραγωγής κ.α. (Kafantaris et al., 2017; Kafantaris, Kotsampasi, et al., 2018; Kafantaris, Stagos, et al., 2018; Kerasioti et al., 2017; Makri et al., 2017). Επιπλέον θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην αντικατάσταση συνθετικών χημικών ενώσεων στην βιομηχανία των καλλυντικών (Afaq & K. Katiyar, 2012; de Lima Cherubim et al., 2020; Nichols & Katiyar, 2010), αλλά και ως φυσικό αντιοξειδωτικό σε συμπληρώματα διατροφής (Adornetto et al., 2020; Cicero et al., 2019; Iervolino et al., 2021; Mlcek et al., 2016; Yessenkyzy et al., 2020). Τέλος ένα πολυφαινολικό εκχύλισμα από τα συγκεκριμένα υποπροϊόντα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων. Μια από της παραπάνω κατευθύνσεις θα μπορούσε να δώσει ένα επιπλέον κίνητρο στον παραγωγό να αξιοποιήσει το απόβλητο που παράγει ώστε να του προσφέρει επιπλέον κέρδος, με ταυτόχρονη προστασία του περιβάλλοντος. Στην ανάγκη να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα χρήσης του παραπροϊόντος στην δημιουργία βιολειτουργικού τρόφιμου, αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και η εκτέλεση ενός επιπλέον παράλληλου πειράματος που περιγράφεται στο παράρτημα στο κεφάλαιο 9.8. Στα πλαίσια αυτού του προτζεκτ έγινε χορήγηση ενός βιολειτουργικού μπισκότου που περιείχε εκχύλισμα βοστρύχων σε μύες για 28 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και ταυτόχρονη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Tekos et al., 2023). Τα

δεδομένα αυτά είναι πολύ σημαντικά και θα πρέπει να ακολουθήσουν και νέα πειράματα ώστε να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα και να γίνει ενημέρωση των οινοποιείων για τη νέα αυτή δυνατότητα που τους ανοίγεται. Η ενημέρωση των παραγωγών και γενικότερα του κλάδου, καθώς και της βιομηχανίας τροφίμων, καλλυντικών και ζωοτροφών είναι ιδιαίτερα σημαντικό σημείο για το διδακτορικό αυτό, καθώς η όλη μελέτη, αφενός έδωσε την δυνατότητα για την εκπαίδευση σε σύγχρονες τεχνικές και γενικότερα επιστημονική γνώση, αφετέρου όμως αυτή η γνώση πρέπει να διαδοθεί και τελικά να αποφέρει κέρδη και προστιθέμενη αξία στα Ελληνικά προϊόντα.

Περνώντας στο τελευταίο, 4^ο επίπεδο αναλύσεων, έγινε χορήγηση σε επίμυες του ισχυρότερου πολυφαινολικού εκχυλίσματος, με βάση τα αποτελέσματα από τα προηγούμενα 3 επίπεδα, το οποίο ήταν το εκχύλισμα που προήλθε από την ποικιλία του Ξινόμαυρου οίνου. Η δόση που χορηγήθηκε επιλέχθηκε με βάση τη μέση κατανάλωση του ανθρώπου, που να μην ξεπερνά και την μέγιστη συνιστώμενη δόση, η οποία και καθορίστηκε σε 2 ποτήρια ανά ημέρα. Η διάρκεια καθορίστηκε σε 14 ημέρες και τα αποτελέσματα έδειξαν ευεργετική επίδραση στο πάγκρεας και το παχύ έντερο, μάλλον επιζήμια στον εγκέφαλο, τα μάτια, την καρδιά και το στομάχι, ενώ δεν παρουσιάστηκε καμία επίδραση στο αίμα. Τέλος διττά ήταν τα αποτελέσματα στους πνεύμονες, τους νεφρούς, τον σπλήνα, τους όρχεις, το λεπτό έντερο, το ήπαρ και τους τετρακέφαλους. Τα αρνητικά αποτελέσματα που είχε το εκχύλισμα σε κάποιους ιστούς αφορούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργάνου και όχι άλλους δείκτες. Για παράδειγμα σε μία παρόμοια μελέτη με χορήγηση εκχυλίσματος μιας άλλης ποικιλίας (Cabernet-Sauvignon), που μελέτησαν την καρδιοπροστατευτική επίδραση ενός μη αλκοολούχου εκχυλίσματος κόκκινου οίνου κατά τη διάρκεια ισχαιμίας και επαναιμάτωσης σε αυθόρμητα υπερτασικούς αρουραίους έδειξε ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα προστατεύει τις καρδιές των πειραματοζώων από συστολικές και διαστολικές μεταβολές που προκαλούνται από ισχαιμία και επαναιμάτωση μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από το οξείδιο του αζώτου (Fantinelli & Mosca, 2007). Σε μία άλλη μελέτη, που χορήγησαν εκχύλισμα ερυθρού οίνου ποικιλίας Alibernet σε Wistar Kyoto, σε παρόμοια δόση και χρονική διάρκεια με αυτή του πειράματος της διατριβής, παρατήρήθηκε ότι στο καρδιαγγειακό σύστημα, το εκχύλισμα ερυθρού οίνου Alibernet μείωσε την έκφραση του NFκB και iNOS που ήταν αυξημένη ως συνέπεια του μεταβολικού συνδρόμου που είχαν τα πειραματόζωα. Το άρθρο

συσχετίζει την επίδραση αυτή με τις προστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των πολυφαινολών του κόκκινου οίνου Alibernet στους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο (Janega et al., 2014). Στον αφορά το μεταβολικό σύνδρομο, μια έρευνα του 2017 έδειξε τις ευεργετικές επιδράσεις που έχει η χορήγηση ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος ερυθρού οίνου στο μεταβολικό σύνδρομο που προκαλείται από δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε επίμυες Wistar. Πιο συγκεκριμένα οι μύες που έλαβαν υψηλή σε λιπαρά διατροφή αύξησαν το σωματικό βάρος πάνω από 20 % καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Παρουσίασαν επίσης αυξημένα επίπεδα C-πεπτιδίου, γλυκόζης, υπεροξειδίων λιπιδίων και οξειδωμένων πρωτεϊνών στο αίμα. Επιπλέον, η υψηλή σε λιπαρά διατροφή αύξησε τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στους ηπατικούς, παγκρεατικούς και αγγειακούς ιστούς, ενώ προκάλεσε και υπερπλασία των νησιδιακών κυττάρων του παγκρέατος και ηπατική στεάτωση. Η προσθήκη πολυφαινολικού εκχυλίσματος ερυθρού οίνου στην υψηλή σε λιπαρά διατροφή μετρίασε αυτές τις επιδράσεις στα επίπεδα οξειδωτικού στρες στο πλάσμα και τους ιστούς καθώς και στην υπερπλασία των νησιδιακών κυττάρων. Ωστόσο, η προσθήκη πολυφαινολικού εκχυλίσματος ερυθρού οίνου δεν προκάλεσε καμία επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ή στην ηπατική στεάτωση. Συνολικά η προσθήκη πολυφαινολικού εκχυλίσματος ερυθρού οίνου έδειξε έναν αντιοξειδωτικό μηχανισμό δράσης κατά του μεταβολικού συνδρόμου και το αποτέλεσμα αυτό θα δώσει πληροφορίες για μελλοντικές μελέτες σε ζώα που θα διερευνήσουν λεπτομερέστερα τις μεταβολικές επιδράσεις των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων οίνων. Τέλος, με βάση τα ευρήματα αυτά, οι συγγραφείς υποστηρίζουν τη χρήση αντιοξειδωτικών με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής ως συμπληρωματικές θεραπείες για ασθενείς με διαβήτη, και η προσθήκη πολυφαινολών από εκχυλίσματα οίνου, θα μπορούσε να αποτελέσει μία τέτοια πηγή αντιοξειδωτικών (Auberval et al., 2017).

Στον αφορά τους λευκούς οίνους, μια μελέτη σε ποικιλία Chardonnay, εμπλουτισμένη με πολυφαινόλες, που προέκυψε με τροποποίηση της οινοποίησης και χαρακτηρίστηκε από τον εμπλουτισμό της σε συνολική περιεκτικότητα πολυφαινολών (1346 mg/l σε σύγκριση με 316 mg/l για το παραδοσιακό Chardonnay) και σε διάφορες μεμονωμένες πολυφαινόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, διμερή προκυανιδινών B1-B4, γαλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ και καφταρικό οξύ) χορηγήθηκε σε επίμυες. Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν 2 δείγματα, ένα εμπλουτισμένο με πολυφαινόλες

λευκό οίνο (W) και ένα παράγωγό του χωρίς αιθανόλη (EFW) και χορηγήθηκαν με γαστροοισοφαγία (10 ml/kg, δύο φορές την ημέρα) για 6 εβδομάδες σε επίμυες που είχαν καταστεί διαβητικοί με μία εφάπαξ ενδοφλέβια ένεση στρεπτοζοτοκίνης (55 mg/kg). Οι διατροφοθεραπείες με τα 2 δείγματα δεν είχαν καμία επίδραση στα συμπτώματα που σχετίζονται με την υπεργλυκαιμία. Ωστόσο, η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος που σχετιζόταν με τη διαβητική κατάσταση στους επίμυες της ομάδας ελέγχου διαβητικών ζώων φάνηκε να αποκαθίσταται με την χορήγηση W ή EFW με την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος σε επίπεδο που δεν διέφερε σημαντικά από αυτό των μη διαβητικών ζώων ελέγχου. Επιπλέον, η επίδραση και των δύο διατροφοθεραπειών εκδηλώθηκε με τη διεύρυνση των μεσεντέριων αρτηριών, όπως προσδιορίστηκε με ποσοτική ιστομορφομετρία. Συνοπτικά, η μελέτη αυτή έδειξε ότι ο λευκός οίνος, όταν είναι εμπλουτισμένος σε πολυφαινόλες, είναι σε θέση να προκαλέσει ανεξάρτητες από την αιθανόλη *in vivo* επιδράσεις σε ένα μοντέλο διαβήτη με ανεπάρκεια ινσουλίνης που χαρακτηρίζονται από μείζον οξειδωτικό στρες (Landrault et al., 2002).

Μια άλλη μελέτη εξετάζει τη δράση της ρεσβερατρόλης στην υποξία-ισχαιμία νεογνών πειραματοζώων. Ο τραυματισμός του νεογνικού εγκεφάλου που προκαλείται από υποξία-ισχαιμία ευθύνεται για ελλειμματική συμπεριφορά που αφορά κυρίως νευρολογικά αντανakλαστικά, αισθητικοκινητικές λειτουργίες και μαθησιακές/μνημονικές διαταραχές, τα οποία μπορεί να εξελίσσονται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της καθυστερημένης έκβασης της χορήγησης ρεσβερατρόλης σε ένα πειραματικό μοντέλο υποξικής-ισχαιμικής εγκεφαλοπάθειας, μέσω ανάλυσης συμπεριφοράς και νευροπαθολογικής εξέτασης. Οι επίμυες ηλικίας επτά ημερών (P7) χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: Η ομάδα 1 υποβλήθηκε σε υποξία-ισχαιμία και έλαβε θεραπεία με ρεσβερατρόλη. Η ομάδα 2) υποβλήθηκε σε υποξία-ισχαιμία και έλαβε τον ίδιο όγκο φυσιολογικού ορού. Η ομάδα 3 (που υποβλήθηκε σε εικονική θεραπεία) ήταν η ομάδα ελέγχου. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμασιών συμπεριφοράς τις ημέρες P8-P66, κατά τη διάρκεια των οποίων εξετάστηκαν τα πρώιμα αντανakλαστικά (αντανakλαστικό δεξιότητα, βάδισμα, γεωταξία), η αισθητικοκινητικότητα (βάδισμα σε δοκό, ρόδα) και η λειτουργία μάθησης/μνήμης (παθητική αποφυγή, λαβύρινθος νερού Morris). Σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων παρατηρήθηκε σε αρκετές δοκιμασίες, στις οποίες η ομάδα της ρεσβερατρόλης έφτασε σχεδόν τις επιδόσεις των ζώων ελέγχου. Οι υπόλοιπες

συμπεριφορικές δοκιμές έδειξαν ότι οι ομάδες ελέγχου και ρεσβερατρόλης ήταν καλύτερες σε σύγκριση με τη υποξία-ισχαιμία, αλλά όχι σημαντικές. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μακροπρόθεσμη νευροπροστατευτική επίδραση της ρεσβερατρόλης στη νεογνική βλάβη της φαιάς και λευκής ουσίας που προκλήθηκε από υποξία-ισχαιμία μπορεί να σχετίζεται με τη διατήρηση των λειτουργιών συμπεριφοράς (Karalis et al., 2011). Τα αποτελέσματα αυτά με τη δράση της ρεσβερατρόλης επιβεβαιώνονται από αρκετές ακόμα μελέτες (Virgili & Contestabile, 2000; Q. Wang et al., 2002; F. Zhang et al., 2010). Ωστόσο πολλές μελέτες έχουν βρει παρόμοια αποτελέσματα και για την κερκετίνη, μια ουσία η οποία ανιχνεύθηκε σε όλους τους οίνους της παρούσας διατριβής, σε αντίθεση με την ρεσβερατρόλη η οποία ανιχνεύθηκε σε μικρή ποσότητα μόνο στο δείγμα από το εκχύλισμα της Μαλαγουζιάς. Πιο συγκεκριμένα σε μια μελέτη διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία με κερκετίνη μετρίασε την απόπτωση των κυττάρων του φλοιού, ενώ κατέστειλε και τον δείκτη απόπτωσης Bax και ενεργοποίησε τον δείκτη αντι-απόπτωσης Bcl-2. Επιπλέον, η θεραπεία με κερκετίνη μείωσε τον αριθμό της μικρογλοΐωσης των κυττάρων του φλοιού και της αστρογλοΐωσης που προκαλείται από τον τραυματισμό λόγω της υποξίας-ισχαιμίας ενώ μείωσε και τη φλεγμονή του φλοιού. Τέλος, η κερκετίνη έδειξε νευροπροστατευτική λειτουργία στην εγκεφαλική βλάβη από υποξία-ισχαιμία μέσω της αναστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού TLR4/NF-κB. Από αυτά τα αποτελέσματα, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η θεραπεία με κερκετίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικό φάρμακο για την πρόληψη και τη μείωση της εγκεφαλικής βλάβης που προκαλείται από την υποξία-ισχαιμία (M. Wu et al., 2019). Σε μια άλλη μελέτη η θεραπεία με κερκετίνη έδειξε ότι μπορεί να βελτιώσει τη μνήμη και την ικανότητα μάθησης καθώς και τη γνωστική ικανότητα σε νεογνούς επίμυες με βλάβη της λευκής ουσίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η κερκετίνη προστατεύει από την βλάβη της λευκής ουσίας που προκύπτει από υποξία-ισχαιμία (J. J. Huang et al., 2012; Qu et al., 2014).

Οι ταννίνες που περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στους ερυθρούς οίνους και πρόσφατα προστίθενται και στους λευκούς σε αντικατάσταση του SO₂, έχει αποδειχθεί ότι ασκούν ευρεία χημειοπροστατευτική δράση κατά του καρκίνου σε διάφορα ζωικά μοντέλα με διάφορους βιοχημικούς μηχανισμούς τόσο στο πρώτο στάδιο της εκκίνησης της καρκινογένεσης, όπου δρουν ανασταλτικά, όσο και κατά το στάδιο της προαγωγής όπου και πάλι δρουν κατασταλτικά. Τα δεδομένα αυτά είναι ιδιαίτερα

σημαντικά και ίσως οι ταννίνες να μπορέσουν να παίξουν καίριο ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου (Nerka et al., 1999). Πρόσφατες μελέτες για το ταννικό οξύ αναγνωρίζουν ότι έχει πληθώρα φαρμακευτικών και βιολογικών εφαρμογών στην ιατρική. Μεταξύ αυτών των επιδράσεων, έχουν αναφερθεί δυνητικές αντικαρκινικές δραστηριότητες έναντι διαφόρων στερεών κακοηθειών, όπως ο καρκίνος του ήπατος, του μαστού, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου και των ωοθηκών. Διαπιστώθηκε ότι το ταννικό οξύ διαδραματίζει ρόλο ελεγκτή στη ρύθμιση διαφόρων ογκολογικών μονοπατιών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των αξόνων JAK/STAT, RAS/RAF/mTOR, TGF-β1/TGF-β1R, VEGF/VEGFR και CXCL12/CXCR4. Οι συνδυαστικές ευεργετικές επιδράσεις του ταννικού οξέος με άλλα συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν καταδειχθεί σαφώς στη βιβλιογραφία, όπως η συνεργιστική αντικαρκινική δράση και η ενίσχυση της χημειοευαισθησίας σε αρκετές περιπτώσεις με ανθεκτικές μορφές καρκίνου. Ωστόσο, οι κλινικές εφαρμογές του ταννικού οξέος έχουν περιοριστεί λόγω της κακής λιποδιαλυτότητας που παρουσιάζει, της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας που έχει, της κακής γεύσης και του μικρού χρόνου ημιζωής που έχει βρεθεί ότι διαθέτει. Για να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, έχουν χρησιμοποιηθεί νέα συστήματα χορήγησης φαρμάκων για την παροχή ταννικού οξέος με στόχο τη βελτίωση των εφαρμογών ή/και της αποτελεσματικότητάς του κατά των καρκινικών κυττάρων. (Cai et al., 2017; Youness et al., 2021). Μεταξύ αυτών των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων είναι διάφοροι τύποι οργανικών και μεταλλικών νανοσωματιδίων. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα γίνεται μεγάλη προσπάθεια για την αξιολόγηση των νανοϋλικών με σκοπό τη χρήση τους ως φορείς βιολειτουργικών μορίων και φαρμάκων (Vardakas et al., 2021, 2022).

Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής, σε συνδυασμό με άλλες μελέτες που έχουν γίνει από ερευνητικά κέντρα σε όλο τον κόσμο έχουν αποκαλύψει τις ευεργετικές δράσεις που έχει ο οίνος καθώς και τα εκχυλίσματα που προέρχονται από αυτόν ή και από παραπροϊόντα κατά την διαδικασία παραγωγής του. Ωστόσο στην βιβλιογραφία υπάρχει έλλειψη σχετικά με τις τοξικολογικές, δυσμενείς επιδράσεις που μπορεί να έχει η κατανάλωση οίνου σε μεγάλες ποσότητες ή και για μεγάλα χρονικά διαστήματα, συνήθεια που υπάρχει σε αρκετά μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Τέτοιου είδους μελέτες σε πειραματόζωα θα βοηθήσουν να κατανοηθούν καλύτερα οι επιδράσεις του οίνου και των εκχυλισμάτων του σε διάφορα όργανα-στόχους και θα

βοηθήσουν στην εύρεση καλύτερης δόσης ή μείγματος ενώσεων στην περίπτωση συμπληρωμάτων διατροφής κτλ. Στην παρούσα μελέτη για παράδειγμα, βρέθηκαν δυσμενείς επιδράσεις σε αρκετούς ιστούς, κάτι που θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Μια μελέτη μεγαλύτερη σε διάρκεια χορήγησης από αυτή που πραγματοποιήθηκε, ενδεχομένως να αποκαλύψει είτε μεγαλύτερης έντασης και περισσότερες δυσμενείς επιδράσεις είτε προσαρμογή του ιστού – οργάνου με αποτέλεσμα μείωση των δυσμενών χαρακτηριστικών που παρατηρήθηκαν στις 14 ημέρες χορήγησης. Επιπλέον, θα πρέπει να γίνουν και άλλες παρόμοιες μελέτες ώστε να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα και να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών δράσης τέτοιων πολύπλοκων μειγμάτων από πλευράς ενώσεων όπως ο οίνος και το εκχύλισμα αυτού. Προς την κατεύθυνση αυτή θα πρέπει να πραγματοποιηθούν και αναλύσεις μεταβολομικής με σκοπό να ανιχνευθούν στοιχεία που υποδηλώνουν φλεγμονή, έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας, τον μεταβολισμό πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπιδίων κ.α.

Λες οι παραπάνω αναλύσεις, είναι επιτακτική ανάγκη να πραγματοποιηθούν σε περισσότερα δείγματα ελληνικών ποικιλιών οίνων, ώστε να δημιουργηθεί μία βάση δεδομένων που θα βοηθήσει το προϊόν να αποκτήσει μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία μέσω της διάχυσης των αποτελεσμάτων σε διεθνή συνέδρια, διεθνές έντυπο και ψηφιακό τύπο κ.α. Μόνο με την διαρκή προβολή αυτών των χαρακτηριστικών των οίνων μπορεί να κερδίσει αγορές και να αυξηθεί το ΑΕΠ της χώρα. Παράλληλα μελέτες στο αμπέλι και τις ποικιλίες του, και συσχέτιση των αποτελεσμάτων αυτών με τους παραγόμενους οίνους αλλά και τις τεχνικές οινοποίησης των διάφορων παραγωγών της χώρας, μπορεί να προκύψει ένας οδηγός καλών πρακτικών με σκοπό τη συνολική βελτίωση της ποιότητας των οίνων της Ελλάδας. Προς αυτήν την κατεύθυνση υλοποιήθηκε και η παρούσα διατριβή αλλά και το ευρύτερο έργο στο οποίο ανήκει, τους «Δρόμους των Αμπελώνων». Στην εμβληματική αυτή δράση έγινε για πρώτη φορά μία ολιστική προσέγγιση, που αφορούσε το αμπέλι και αναλύσεις στους καρπούς, τα φύλλα, το έδαφος, το κλίμα κ.α., τεχνικές οινοποίησης και αναλύσεις βιοδραστικότητας και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στους παραγόμενους οίνους. Η δράση αυτή έδωσε μία σοβαρή επιστημονικά πρώτη αξιολόγηση της κατάστασης του αμπελο-οινικού τομέα της χώρας. Ωστόσο, η μελέτη αυτή, πρέπει να συνεχιστεί τόσο με την μελέτη και χαρτογράφηση περισσότερων ποικιλιών αλλά και την πραγματοποίηση προκλινικών μελετών σε πειραματόζωα ώστε να δημιουργηθούν

δεδομένα σε *in vivo* συστήματα. Επιπρόσθετα, είναι αδήριτη ανάγκη να πραγματοποιηθούν κλινικές μελέτες σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες για την αξιολόγηση των δράσεων που προκαλεί η κατανάλωση ελληνικών οίνων στην υγεία και ευεξία των ανθρώπων. Αντίστοιχες κλινικές μελέτες πρέπει να γίνουν και για την επίδραση που έχουν τα εκχυλίσματα οίνου και υποπροϊόντων της οινοποίησης που προστίθενται σε συμπληρώματα διατροφής, βιολειτουργικά τρόφιμα καθώς και καλλυντικά με σκοπό να επιβεβαιωθούν οι επιπλέον ιδιότητες των αντίστοιχων προϊόντων. Τέλος, καθώς υποπροϊόντα της οινοποίησης μπορούν να προστεθούν σε ζωοτροφές, είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν κλινικές μελέτες σε ανθρώπους που έχουν στην διατροφή τους κρεατοσκευάσματα, ιχθυρά, γαλακτοκομικά και αυγά κ.α. από ζώα που έχουν καταναλώσει αυτές τις ζωοτροφές.

8 Κατακλείδα

Εν κατακλείδι, η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε σε 4 επίπεδα και εξέτασε τη δράση 4 εμβληματικών Ελληνικών ποικιλιών οίνων, Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Ασύρτικο και Μαλαγουζιά με σκοπό την ανάδειξη και την ενίσχυση της ανταγωνιστικότητάς τους σε σχέση με άλλους διεθνούς φήμης οίνους που έχουν μελετηθεί από εργαστήρια του εξωτερικού. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε πιστοποίησε τη μεγάλη βιοδραστική ικανότητα των Ελληνικών ερυθρών και λευκών ποικιλιών και ανέδειξε την αντιοξειδωτική, αντιμεταλαξιγόνο, κυτταροπροστατευτική δράση αυτών. Τέλος, η ποικιλία Ξινόμαυρο χορηγήθηκε σε πειραματόζωα και ανέδειξε την βιολογική και βιοχημική της δράση σε ιστούς και όργανα των επίμων. Το σημαντικότερο ωστόσο αποτέλεσμα της τριετούς αυτής μελέτης είναι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε, η οποία μπορεί πλέον να πραγματοποιηθεί σε οποιαδήποτε ποικιλία αμπέλου, οίνου ή και υποπροϊόντων εύκολα και γρήγορα, αξιολογώντας τις δυνατότητες των υπό ανάλυση δειγμάτων με σκοπό την άμεση και γρήγορη βοήθεια των οινοποιείων και παραγωγών στην αύξηση της προστιθέμενης αξίας τους χωρίς να χρειάζεται εξ' αρχής εύρεση μεθοδολογίας, πρωτοκόλλων, συγκεντρώσεων κτλ. Έτσι ακολουθείται η πάντα διαχρονική ρήση του Ισοκράτη...

Βουλεύου μεν βραδέως, εκτελεί δε ταχέως τα δόξαντα.

Να σχεδιάζεις χωρίς βιασύνη αλλά να εκτελείς γρήγορα.

Ισοκράτης, 436-338 π.Χ., Αθηναίος ρήτορας

9 Βιβλιογραφία

- Adornetto, A., Rombolà, L., Morrone, L. A., Nucci, C., Corasaniti, M. T., Bagetta, G., & Russo, R. (2020). Natural Products: Evidence for Neuroprotection to Be Exploited in Glaucoma. *Nutrients*, 12(10), 1–33. <https://doi.org/10.3390/NU12103158>
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Afaq, F., & K. Katiyar, S. (2012). Polyphenols: Skin Photoprotection and Inhibition of Photocarcinogenesis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(14), 1200–1215. <https://doi.org/10.2174/13895575111091200>
- Ahn, K., Pan, S., Beningo, K., & Hupe, D. (1995). A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. *Life Sciences*, 56(26), 2331–2341. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00227-W](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00227-W)
- Akimov, M. Y., Bessonov, V. v., Kodentsova, V. M., Eller, K. I., Vrzhesinskaya, O. A., Beketova, N. A., Kosheleva, O. v., Bogachuk, M. N., Malinkin, A. D., Makarenko, M. A., Shevyakova, L. v., Perova, I. B., Rylina, E. v., Makarov, V. N., Zhidehina, T. v., Koltsov, V. A., Yushkov, A. N., Novotortsev, A. A., Briksin, D. M., & Khromov, N. v. (2020). Biological value of fruits and berries of Russian production. *Voprosy Pitaniia*, 89(4), 220–232. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10055>
- Albers, T. M., Simon, M. A., & Clifford, C. B. (2009). Histopathology of naturally transmitted “rat respiratory virus”: Progression of lesions and proposed diagnostic criteria. *Veterinary Pathology*, 46(5), 992–999. https://doi.org/10.1354/VP.08-VP-0330-C-FL/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1354_VP.08-VP-0330-C-FL-FIG2.JPEG
- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A. B., Bravo, L., & Goya, L. (2006). Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212(2), 110–118. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2005.07.014>
- Aliyev, A. T., Panieri, E., Stepanić, V., Gurer-Orhan, H., & Saso, L. (2021). Involvement of NRF2 in breast cancer and possible therapeutical role of polyphenols and melatonin. *Molecules*, 26(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071853>
- Alonso, Á. M., Domínguez, C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2002). Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method

- and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3112–3115. <https://doi.org/10.1021/jf0116101>
- Aluyen, J. K., Ton, Q. N., Tran, T., Yang, A. E., Gottlieb, H. B., & Bellanger, R. A. (2012). Resveratrol: Potential as anticancer agent. *Journal of Dietary Supplements*, 9(1), 45–56. <https://doi.org/10.3109/19390211.2011.650842>
- Ames, B. N. (1982). Carcinogens and anti-carcinogens. *Progress in Clinical and Biological Research*, 109, 3–19.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617), 1256–1264. <https://doi.org/10.1126/science.6351251>
- Ames, B. N. (1984). Dietary carcinogens and anti-carcinogens. *Clinical Toxicology*, 22(3), 291–301. <https://doi.org/10.3109/15563658408992561>
- Amor, S., Châlons, P., Aires, V., & Delmas, D. (2018). Polyphenol Extracts from Red Wine and Grapevine: Potential Effects on Cancers. *Diseases*, 6(4), 106. <https://doi.org/10.3390/DISEASES6040106>
- Anand David, A. V., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- Anastasiadi, M., Zira, A., Magiatis, P., Haroutounian, S. A., Skaltsounis, A. L., & Mikros, E. (2009). ¹H NMR-based metabonomics for the classification of Greek wines according to variety, region, and vintage. Comparison with HPLC data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11067–11074. <https://doi.org/10.1021/JF902137E>
- Andreatta, M. M., Navarro, A., Muñoz, S. E., Aballay, L., & Eynard, A. R. (2010). Dietary patterns and food groups are linked to the risk of urinary tract tumors in Argentina. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 19(6), 478–484. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0B013E32833EBAB6>
- Angermüller, S., Islinger, M., & Völkl, A. (2009). Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(4), 459–463. <https://doi.org/10.1007/S00418-009-0563-7>
- Anli, R. E., & Vural, N. (2009). Antioxidant Phenolic Substances of Turkish Red Wines from Different Wine Regions. *Molecules*, 14(1), 289. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES14010289>

- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.
<https://doi.org/10.1039/B009171P>
- Aon, M. A., Cortassa, S., & O'Rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6–7), 865–877.
<https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2010.02.016>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Apostolou, A., Stagos, D., Galitsiou, E., Spyrou, A., Haroutounian, S., Portesis, N., Trizoglou, I., Wallace Hayes, A., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.029>
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, 5.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00196>
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5736–5742.
<https://doi.org/10.1021/JF010827S>
- Auberval, N., Dal, S., Maillard, E., Bietiger, W., Peronet, C., Pinget, M., Schini-Kerth, V., & Sigrist, S. (2017). Beneficial effects of a red wine polyphenol extract on high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *European Journal of Nutrition*, 56(4), 1467–1475. <https://doi.org/10.1007/S00394-016-1192-2>
- Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research*, 66(2), 121–127.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0B013E3181A9EAFB>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azeem, M., Hanif, M., Mahmood, K., Ameer, N., Chughtai, F. R. S., & Abid, U. (2022). An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-

- inflammatory effects of quercetin: a review. *Polymer Bulletin (Berlin, Germany)*, 80(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04091-8>
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, 109(1), 33–44. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00481-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00481-2)
- Bai, P. Y., Chen, S. Q., Jia, D. le, Pan, L. H., Liu, C. B., Liu, J., Luo, W., Yang, Y., Sun, M. Y., Wan, N. F., Rong, W. W., Sun, A. J., & Ge, J. B. (2022). Environmental eustress improves postinfarction cardiac repair via enhancing cardiac macrophage survival. *Science Advances*, 8(17). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABM3436>
- Baird, L., & Yamamoto, M. (2020). The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 40(13). <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>
- Bajpai, V. K., Alam, M. B., Quan, K. T., Kwon, K. R., Ju, M. K., Choi, H. J., Lee, J. S., Yoon, J. I., Majumder, R., Rather, I. A., Kim, K., Lee, S. H., & Na, M. K. (2017). Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression by (+)-lariciresinol, a lignan isolated from *Rubia philippinensis*, through the activation of p38. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep46035>
- Baker, D. G. (1998). Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 231–266. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.231>
- Banc, R., Popa, D. S., Cozma-Petruț, A., Filip, L., Kiss, B., Fărcaș, A., Nagy, A., Miere, D., & Loghin, F. (2022). Protective Effects of Wine Polyphenols on Oxidative Stress and Hepatotoxicity Induced by Acrylamide in Rats. *Antioxidants*, 11(7), 1347. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11071347/S1>
- Banks, G., & Overton, J. (2010). Old world, new world, third world? Reconceptualising the worlds of wine. *Journal of Wine Research*, 21(1), 57–75. <https://doi.org/10.1080/09571264.2010.495854>
- Barbalho, S. M., Bueno Ottoboni, A. M. M., Fiorini, A. M. R., Guiguer, É. L., Nicolau, C. C. T., Goulart, R. de A., & Flato, U. A. P. (2020). Grape juice or wine: which is the best option? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22), 3876–3889. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1710692>
- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 1–21. <https://doi.org/10.5402/2012/137289>

- Basli, A., Soulet, S., Chaher, N., Mérillon, J. M., Chibane, M., Monti, J. P., & Richard, T. (2012). Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/805762>
- Batchuluun, B., Pinkosky, S. L., & Steinberg, G. R. (2022). Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 21(4), 283–305. <https://doi.org/10.1038/S41573-021-00367-2>
- Bauersachs, J., & Widder, J. D. (2010). Reductive stress: linking heat shock protein 27, glutathione, and cardiomyopathy? *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 55(6), 1299–1300. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153296>
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(6), 493–506. <https://doi.org/10.1038/NRD2060>
- Baydar, N. G., Sagdic, O., Ozkan, G., & Cetin, S. (2006). Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(7), 799–804. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2005.01095.X>
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(5), 721–733. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.02.010>
- Bentivegna, S. S., & Whitney, K. M. (2002). Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1731–1743. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00155-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00155-2)
- Bertelli, A. A. A., & Das, D. K. (2009). Grapes, wines, resveratrol, and heart health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 468–476. <https://doi.org/10.1097/FJC.0B013E3181BFAFF3>
- Bhatia, V., & Sharma, S. (2021). Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 421. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.117253>
- Bienertova-Vasku, J., Lenart, P., & Scherlinger, M. (2020). Eustress and Distress: Neither Good Nor Bad, but Rather the Same? *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 42(7). <https://doi.org/10.1002/BIES.201900238>
- Blackwell, T. K., Steinbaugh, M. J., Hourihan, J. M., Ewald, C. Y., & Isik, M. (2015). SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical*

- Biology and Medicine*, 88(Part B), 290–301.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008>
- Blalock, D. v., Berlin, S. A., Young, J. R., Blakey, S. M., Calhoun, P. S., & Dedert, E. A. (2022). Effects of Alcohol Reduction Interventions on Blood Pressure. *Current Hypertension Reports*, 24(4), 75–85. <https://doi.org/10.1007/s11906-022-01171-y>
- Boban, M., & Modun, D. (2010). Uric acid and antioxidant effects of wine. *Croatian Medical Journal*, 51(1), 16–22. <https://doi.org/10.3325/CMJ.2010.51.16>
- Bonekamp, N. A., Völkl, A., Fahimi, H. D., & Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *BioFactors*, 35(4), 346–355. <https://doi.org/10.1002/BIOF.48>
- Bonnefont-Rousselot, D. (2016). Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/NU8050250>
- Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M. C., van Veen, E., Czopik, A., Steele, A. D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W., & Guarente, L. (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*, 6(6), 759–767. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2007.00335.X>
- Boutten, A., Goven, D., Artaud-Macari, E., Boczkowski, J., & Bonay, M. (2011). NRF2 targeting: A promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.02.006>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brenna, O. v., & Pagliarini, E. (2001). Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4841–4844. <https://doi.org/10.1021/jf0104376>
- Brigelius-Flohé, R., & Davies, K. J. A. (2007). Is vitamin E an antioxidant, a regulator of signal transduction and gene expression, or a “junk” food? Comments on the two accompanying papers: ‘Molecular mechanism of α -tocopherol action’ by A. Azzi and ‘Vitamin E, antioxidant and nothing more’ by M. Traber and J. Atkinson. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 2–3. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.016>

- Bubb, K. J., Drummond, G. R., & Figtree, G. A. (2020). New opportunities for targeting redox dysregulation in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 116(3), 532–544. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz183>
- Burr, M. L. (1995). Explaining the French paradox. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 115(4), 217–219. <https://doi.org/10.1177/146642409511500404>
- Butterfield, D. A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenov, M., Aksenova, M., & Carney, J. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 448–462. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1998.TB09924.X>
- Cabello-Verrugio, C., Simon, F., Trollet, C., & Santibañez, J. F. (2017). Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4310469>
- Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1859(9), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.019>
- Cai, Y., Zhang, J., Chen, N. G., Shi, Z., Qiu, J., He, C., & Chen, M. (2017). Recent Advances in Anticancer Activities and Drug Delivery Systems of Tannins. *Medicinal Research Reviews*, 37(4), 665–701. <https://doi.org/10.1002/MED.21422>
- Calabrese, E. J. (2018). Hormesis: Path and Progression to Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS19102871>
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (1998a). A general classification of U-shaped dose-response relationships in toxicology and their mechanistic foundations. *Human and Experimental Toxicology*, 17(7), 353–364. <https://doi.org/10.1177/096032719801700701>
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (1998b). Hormesis as a biological hypothesis. *Environmental Health Perspectives*, 106(SUPPL. 1), 357–362. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106s1357>
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2001a). The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicological Sciences*, 62(2), 330–338. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.330>

- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2001b). Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(6), 285–291. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01719-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01719-3)
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(7), 331–337. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02034-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02034-5)
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicological Sciences*, 71(2), 246–250. <https://doi.org/10.1093/toxsci/71.2.246>
- Calabrese, E. J., Baldwin, L. A., & Holland, C. D. (1999). Hormesis: A highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Analysis*, 19(2), 261–281. <https://doi.org/10.1023/A:1006977728215>
- Calabrese, E. J., & Blain, R. (2005). The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: An overview. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(3), 289–301. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.023>
- Calabrese, E. J., & Blain, R. B. (2011). The hormesis database: The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 61(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.06.003>
- Calabrese, E. J., Dhawan, G., Kapoor, R., Iavicoli, I., & Calabrese, V. (2016). HORMESIS: A fundamental concept with widespread biological and biomedical applications. *Gerontology*, 62(5), 530–535. <https://doi.org/10.1159/000441520>
- Calabrese, E. J., Mattson, M. P., Dhawan, G., Kapoor, R., Calabrese, V., & Giordano, J. (2020). Hormesis: A potential strategic approach to the treatment of neurodegenerative disease. *International Review of Neurobiology*, 155, 271–301. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2020.03.024>
- Calabrese, V., Cornelius, C., Mancuso, C., Pennisi, G., Calafato, S., Bellia, F., Bates, T. E., Giuffrida Stella, A. M., Schapira, T., Dinkova Kostova, A. T., & Rizzarelli, E. (2008). Cellular stress response: A novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochemical Research*, 33(12), 2444–2471. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9775-9>
- Calabrese, V., Cornelius, C., Trovato-Salinaro, A., Cambria, M., Locascio, M., Rienzo, L., Condorelli, D., Mancuso, C., de Lorenzo, A., & Calabrese, E. (2010). The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases. *Current*

- Pharmaceutical Design*, 16(7), 877–883.
<https://doi.org/10.2174/138161210790883615>
- Canning, P., Sorrell, F. J., & Bullock, A. N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Part B), 101–107.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.05.034>
- Čapek, J., & Roušar, T. (2021). Detection of oxidative stress induced by nanomaterials in cells—the roles of reactive oxygen species and glutathione. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164710>
- Carbó, N., Costelli, P., Baccino, F. M., López-Soriano, F. J., & Argilés, J. M. (1999). Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(3), 739–743. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1998.9916>
- Cassino, C., Gianotti, V., Bonello, F., Tsolakis, C., Cravero, M. C., & Osella, D. (2016). Antioxidant Composition of a Selection of Italian Red Wines and Their Corresponding Free-Radical Scavenging Ability. *Journal of Chemistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4565391>
- Cederbaum, A. (2009). Nrf2 and antioxidant defense against CYP2E1 toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 5(10), 1223–1244.
<https://doi.org/10.1517/17425250903143769>
- CELL SEARCH SYSTEM -CELL BANK- (RIKEN BRC) [RCB1001 : MKN45]. (n.d.). Retrieved January 27, 2023, from
https://cellbank.brc.riken.jp/cell_bank/CellInfo/?cellNo=RCB1001
- Chakraborti, S., & Chakraborti, T. (1998). Oxidant-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear transcription factors in the cardiovascular system: A brief overview. *Cellular Signalling*, 10(10), 675–683.
[https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00014-X)
- Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11(12), 914.
<https://doi.org/10.1038/EMBOR.2010.179>
- Chang, C. C., Chang, C. Y., Wu, Y. T., Huang, J. P., Yen, T. H., & Hung, L. M. (2011). Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *Journal of Biomedical Science*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-47>

- Chang, S. T., Wu, J. H., Wang, S. Y., Kang, P. L., Yang, N. S., & Shyur, L. F. (2001). Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3420–3424. <https://doi.org/10.1021/JF0100907>
- Chaves, A. A., Joshi, M. S., Coyle, C. M., Brady, J. E., Dech, S. J., Schanbacher, B. L., Baliga, R., Basuray, A., & Bauer, J. A. (2009). Vasoprotective endothelial effects of a standardized grape product in humans. *Vascular Pharmacology*, 50(1–2), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.08.004>
- Chen, B., Lu, Y., Chen, Y., & Cheng, J. (2015). The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *Journal of Endocrinology*, 225(3), R83–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0662>
- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Neuroscience Bulletin*, 30(2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/S12264-013-1423-Y>
- Cheng, J., Nanayakkara, G., Shao, Y., Cueto, R., Wang, L., Yang, W. Y., Tian, Y., Wang, H., & Yang, X. (2017). Mitochondrial proton leak plays a critical role in pathogenesis of cardiovascular diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 982, 359–370. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_20
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90(5), 856–867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Chrysohoou, C., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Skoumas, J., Toutouza, M., Papaioannou, I., Toutouzas, P. K., & Stefanadis, C. (2003). Effects of chronic alcohol consumption on lipid levels, inflammatory and haemostatic factors in the general population: The ‘attica’ study. *European Journal of Preventive Cardiology*, 10(5), 355–361. <https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000065928.57001.4d>
- Chrysoula, S., Veskoukis, A. S., Dimitrios, S., Kalliopi, L., Maria, A., Haroutounian, S. A., Maria, T., Eleni, T., & Dimitrios, K. (2011). Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo (Athens, Greece)*, 25(4), 657–662. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21709010/>
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421–464. <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>
- Cicero, A. F. G., Allkanjari, O., Vitalone, A., Busetto, G. M., Cai, T., Larganà, G., Russo, G. I., Magri, V., Perletti, G., della Cuna, F. S. R., Stamatiou, K., & Trinchieri, A. (2019). Nutraceutical treatment and prevention of benign prostatic hyperplasia

- and prostate cancer. *Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia : Organo Ufficiale [Di] Societa Italiana Di Ecografia Urologica e Nefrologica*, 91(3), 139–152.
<https://doi.org/10.4081/AIUA.2019.3.139>
- Clean and Circular economy: Commission extends EU Ecolabel to all cosmetics and pet-care.* (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from
https://environment.ec.europa.eu/news/clean-and-circular-economy-commission-extends-eu-ecolabel-all-cosmetics-and-pet-care-2021-10-22_en
- Collin, F. (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS20102407>
- Corona, G., Vauzour, D., Hercelin, J., Williams, C. M., & Spencer, J. P. E. (2013). Phenolic acid intake, delivered via moderate champagne wine consumption, improves spatial working memory via the modulation of hippocampal and cortical protein expression/activation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(14), 1676–1689. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.5142>
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Caruso, E., Tsoukalas, D., Margina, D., Dardiotis, E., Kouretas, D., & Fenga, C. (2017). Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 286–299.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.023>
- Costello, J. L., Passmore, J. B., Islinger, M., & Schrader, M. (2018). Multi-localized proteins: The peroxisome-mitochondria connection. *Subcellular Biochemistry*, 89, 383–415. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2233-4_17
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology & Medicine*, 95, 27–42.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.02.028>
- Criqui, M. H., & Ringel, B. L. (1994). Does diet or alcohol explain the French paradox? *The Lancet*, 344(8939–8940), 1719–1723. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92883-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92883-5)
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356.
<https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.09.002>
- da Luz, P. L., & Coimbra, S. R. (2004). Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*

- = *Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 37(9), 1275–1295.
<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000900001>
- Damiano, S., Sozio, C., la Rosa, G., Guida, B., Faraonio, R., Santillo, M., & Mondola, P. (2020). Metabolism Regulation and Redox State: Insight into the Role of Superoxide Dismutase 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–22. <https://doi.org/10.3390/IJMS21186606>
- Darias-Martín, J. J., Rodríguez, O., Díaz, E., & Lamuela-Raventós, R. M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, 71(4), 483–487. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00177-1)
- de Flora, S., & Ramel, C. (1988). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Research*, 202(2), 285–306. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90193-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90193-5)
- de Gaetano, G., di Castelnuovo, A., Donati, M. B., & Iacoviello, L. (2003). The Mediterranean lecture: Wine and thrombosis - From epidemiology to physiology and back. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33(5–6), 466–471. <https://doi.org/10.1159/000083847>
- de la Fuente, M. (2002). Effects of antioxidants on immune system ageing. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, S5–S8. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601476>
- de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Martins, C. V., Oliveira Fariña, L., & da Silva de Lucca, R. A. (2020). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(1), 33–37. <https://doi.org/10.1111/JOCD.13093>
- de Moura, C. F. G., Ribeiro, F. A. P., Handan, B. A., Aguiar, O., Oshima, C. T. F., & Ribeiro, D. A. (2016). Grape Juice Concentrate Protects Rat Liver Against Cadmium Intoxication: Histopathology, Cytochrome C and Metalloproteinases Expression. *Drug Research*, 66(7), 339–344. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569452>
- de Moura, C. F. G., Ribeiro, F. A. P., Pacheco de Jesus, G. P., Pereira da Silva, V. H., Oshima, C. T. F., Gollücke, A. P. B., Aguiar, O., & Ribeiro, D. A. (2014). Antimutagenic and antigenotoxic potential of grape juice concentrate in blood and liver of rats exposed to cadmium. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(22). <https://doi.org/10.1007/S11356-014-3257-1>
- de Oliveira Silva, E., & Batista, R. (2017). Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food*

- Science and Food Safety*, 16(4), 580–616. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12266>
- de Toledo, F. W., Grundler, F., Goutzourelas, N., Tekos, F., Vassi, E., Mesnage, R., & Kouretas, D. (2020). Influence of Long-Term Fasting on Blood Redox Status in Humans. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9060496>
- Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M., & Roberts, R. (2012). Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology*, 2012, 13. <https://doi.org/10.1155/2012/645460>
- del Río, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P., & Corpas, F. J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(5), 557–580. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90150-F](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90150-F)
- Deshmukh, P., Unni, S., Krishnappa, G., & Padmanabhan, B. (2017a). The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophysical Reviews*, 9(1), 41–56. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0244-4>
- Deshmukh, P., Unni, S., Krishnappa, G., & Padmanabhan, B. (2017b). The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases. *Biophysical Reviews*, 9(1), 41–56. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0244-4>
- Dhanoa, B. S., Cogliati, T., Satish, A. G., Bruford, E. A., & Friedman, J. S. (2013). Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Human Genomics*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-7-13/FIGURES/2>
- Ditano-Vázquez, P., Torres-Peña, J. D., Galeano-Valle, F., Pérez-Caballero, A. I., Demelo-Rodríguez, P., Lopez-Miranda, J., Katsiki, N., Delgado-Lista, J., & Alvarez-Sala-Walther, L. A. (2019). The Fluid Aspect of the Mediterranean Diet in the Prevention and Management of Cardiovascular Disease and Diabetes: The Role of Polyphenol Content in Moderate Consumption of Wine and Olive Oil. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/NU11112833>
- Djordjevic, V., Zvezdanovic, L., & Cosic, V. (2008). Oxidative stress in human diseases. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 136(Suppl. 2), 158–165. <https://doi.org/10.2298/SARH08S2158D>
- Djoussé, L., Ellison, R. C., Beiser, A., Scaramucci, A., D’Agostino, R. B., & Wolf, P. A. (2002). Alcohol consumption and risk of ischemic stroke: The Framingham Study. *Stroke*, 33(4), 907–912. <https://doi.org/10.1161/HS0402.105245>

- Dolara, P., Luceri, C., de Filippo, C., Femia, A. pietro, Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., & Cresci, A. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation Research*, 591(1–2), 237–246. <https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2005.04.022>
- Dominguez, M., Brüne, B., & Namgaladze, D. (2021). Exploring the Role of ATP-Citrate Lyase in the Immune System. *Frontiers in Immunology*, 12, 14. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.632526/BIBTEX>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00018.2001>
- EA.hy926 - CRL-2922 / ATCC. (n.d.). Retrieved January 27, 2023, from <https://www.atcc.org/products/crl-2922>
- eAmbrosia. (n.d.). Retrieved January 13, 2023, from <https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/food-safety-and-quality/certification/quality-labels/geographical-indications-register/>
- Echave, J., Barral, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Bottle Aging and Storage of Wines: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26030713>
- Eckl, P. M., & Bresgen, N. (2017). Genotoxicity of lipid oxidation compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.002>
- Elejalde, E., Villarán, M. C., & Alonso, R. M. (2021). Grape polyphenols supplementation for exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00395-0>
- Elmali, N., Baysal, O., Harma, A., Esenkaya, I., & Mizrak, B. (2007). Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*, 30(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/S10753-006-9012-0>
- Elmali, N., Esenkaya, I., Harma, A., Ertem, K., Turkoz, Y., & Mizrak, B. (2005). Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflammation Research*, 54(4), 158–162. <https://doi.org/10.1007/s00011-004-1341-6>
- El-Saber Batiha, G., Beshbishy, A. M., Ikram, M., Mulla, Z. S., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Algammal, A. M., & Ali Elewa, Y. H. (2020). The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural

- Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(3).
<https://doi.org/10.3390/FOODS9030374>
- Elwell, M. R., Mahler, J. F., & Rao, G. N. (1997). "Have you seen this?" Inflammatory lesions in the lungs of rats. *Toxicologic Pathology*, 25(5), 529–531.
https://doi.org/10.1177/019262339702500520/ASSET/019262339702500520.FP.PNG_V03
- Érnia Juan, M., Pilar Vinardell, M., & Planas, J. M. (2002). The Daily Oral Administration of High Doses of trans-Resveratrol to Rats for 28 Days Is Not Harmful. *The Journal of Nutrition*, 132(2), 257–260.
<https://doi.org/10.1093/JN/132.2.257>
- Eran Nagar, E., Okun, Z., & Shpigelman, A. (2023). In vitro bioaccessibility of polyphenolic compounds: The effect of dissolved oxygen and bile. *Food Chemistry*, 404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134490>
- Erexson, G. L. (2003). Lack of in vivo clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 347–350. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00236-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00236-3)
- Esterbauer, H., Eckl, P., & Ortner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research*, 238(3), 223–233.
[https://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90014-3)
- EUIPO - eSearch. (n.d.-a). Retrieved February 5, 2023, from
<https://euipo.europa.eu/eSearch/#details/designs/004112415-0002>
- EUIPO - eSearch. (n.d.-b). Retrieved February 5, 2023, from
<https://euipo.europa.eu/eSearch/#details/trademarks/018249644>
- Fang, F., Li, J. M., Pan, Q. H., & Huang, W. D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chemistry*, 101(1), 428–433.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.12.036>
- Fantinelli, J. C., & Mosca, S. M. (2007). Cardioprotective effects of a non-alcoholic extract of red wine during ischaemia and reperfusion in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 34(3), 166–169. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1681.2007.04567.X>
- FAOSTAT. (n.d.-a). Retrieved January 15, 2023, from
<https://www.fao.org/faostat/en/#search/grapes>
- FAOSTAT. (n.d.-b). Retrieved January 15, 2023, from
<https://www.fao.org/faostat/en/#data>

- Farkhondeh, T., Folgado, S. L., Pourbagher-Shahri, A. M., Ashrafizadeh, M., & Samarghandian, S. (2020). The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 127. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110234>
- Farm to Fork Strategy*. (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en
- Fedorova, M., Bollineni, R. C., & Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(2), 79–97. <https://doi.org/10.1002/MAS.21381>
- Ferruelo, A., de Las Heras, M. M., Redondo, C., Ramón De Fata, F., Romero, I., & Angulo, J. C. (2014). Wine polyphenols exert antineoplastic effect on androgen resistant PC-3 cell line through the inhibition of the transcriptional activity of COX-2 promoter mediated by NF-κβ. *Actas Urologicas Espanolas*, 38(7), 429–437. <https://doi.org/10.1016/J.ACURO.2014.02.017>
- File:Wine grape diagram en.svg - Wikimedia Commons*. (n.d.). Retrieved January 29, 2023, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Wine_grape_diagram_en.svg
- Fitzgerald, A. L., Osman, A. A., Xie, T. X., Patel, A., Skinner, H., Sandulache, V., & Myers, J. N. (2015). Reactive oxygen species and p21Waf1/Cip1 are both essential for p53-mediated senescence of head and neck cancer cells. *Cell Death & Disease*, 6(3). <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2015.44>
- Flamini, R., Mattivi, F., de Rosso, M., Arapitsas, P., & Bavaresco, L. (2013). Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19651. <https://doi.org/10.3390/IJMS141019651>
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2011.01.008>
- Folts, J. D. (2002). Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 505, 95–111. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5235-9_9
- Fontana, A. R., Antoniolli, A., & Bottini, R. (2016). Development of a high-performance liquid chromatography method based on a core-shell column approach for the rapid determination of multiclass polyphenols in grape

- pomaces. *Food Chemistry*, 192, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.06.101>
- Forman, H. J., Ursini, F., & Maorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 2–9.
<https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2014.01.018>
- Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(9), 689–709. <https://doi.org/10.1038/S41573-021-00233-1>
- Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2008.08.006>
- Forthcoming Exhibition on Ancient Theater at the Museum of Cycladic Art - Greece Is.* (n.d.). Retrieved January 12, 2023, from <https://www.greece-is.com/news/forthcoming-exhibition-ancient-theater-museum-cycladic-art/>
- Fransen, M., Lismont, C., & Walton, P. (2017). The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS18061126>
- Friedman, M. (2014). Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6025–6042. <https://doi.org/10.1021/JF501266S>
- Friguet, B. (2002). Aging of proteins and the proteasome. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 29, 17–33. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56373-7_2
- Friguet, B., Bulteau, A. L., Chondrogianni, N., Conconi, M., & Petropoulos, I. (2000). Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 143–154.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06643.x>
- Frojdo, S., Durand, C., & Pirola, L. (2008). Metabolic effects of resveratrol in mammals--a link between improved insulin action and aging. *Current Aging Science*, 1(3), 145–151. <https://doi.org/10.2174/1874609810801030145>
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., & Milgroom, M. G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology*, 13(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00728.X>

- Galaris, D., & Γάλαρης, Δ. (2016). Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες. *1*, 30–31. <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/5113>
- Gallorini, M., Petzel, C., Bolay, C., Hiller, K. A., Cataldi, A., Buchalla, W., Krifka, S., & Schweikl, H. (2015). Activation of the Nrf2-regulated antioxidant cell response inhibits HEMA-induced oxidative stress and supports cell viability. *Biomaterials*, *56*, 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.03.047>
- García, N., Zazueta, C., & Aguilera-Aguirre, L. (2017). Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5853238>
- Gasmi, A., Mujawdiya, P. K., Noor, S., Lysiuk, R., Darmohray, R., Piscopo, S., Lenchyk, L., Antonyak, H., Dehtiarova, K., Shanaida, M., Polishchuk, A., Shanaida, V., Peana, M., & Bjørklund, G. (2022). Polyphenols in Metabolic Diseases. *Molecules*, *27*(19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196280>
- Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *7*(5). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX7050062>
- Geographical indications and quality schemes explained*. (n.d.). Retrieved January 13, 2023, from https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes/geographical-indications-and-quality-schemes-explained_en
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I. A., & Spanos, M. (2006). trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, *17*(9), 700–706. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2005.04.006>
- Giles, G. I., Nasim, M. J., Ali, W., & Jacob, C. (2017). The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On. *Antioxidants 2017, Vol. 6, Page 38*, *6*(2), 38. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX6020038>
- Giles, G. I., Tasker, K. M., & Jacob, C. (2001). Hypothesis: The role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *31*(10), 1279–1283. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00710-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00710-9)
- Giudice, A., Arra, C., & Turco, M. C. (2010). Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods in Molecular Biology*, *647*, 37–74. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-738-9_3

- GK, G., EC, T., AM, K., & DA, G. (2005). Uric acid and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, 11(32), 4145–4151.
<https://doi.org/10.2174/138161205774913255>
- Goldberg, D. M., Karumanchiri, A., Ng, E., Yan, J., Diamandis, E. P., & Soleas, G. J. (1995). Direct Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Method To Assay cis-Resveratrol in Wines: Preliminary Survey of Its Concentration in Commercial Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5), 1245–1250.
https://doi.org/10.1021/JF00053A023/ASSET/JF00053A023.FP.PNG_V03
- Goldberg, D. M., Ng, E., Karumanchiri, A., Yan, J., Diamandis, E. P., & Soleas, G. J. (1995). Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 708(1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00368-W](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00368-W)
- Goldberg, D. M., Ng, E., Yan, J., Karumanchiri, A., Soleas, G. J., & Diamandis, E. P. (2007). Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/09571269608718057](http://Dx.Doi.Org/10.1080/09571269608718057), 21(1), 13–24. <https://doi.org/10.1080/09571269608718057>
- Gollucke, A. P. B., Claudio, S. R., Yamamura, H., Morais, D. R., Bataglion, G. A., Eberlin, M. N., Aguiar, O., & Ribeiro, D. A. (2018). Grape skin extract mitigates tissue degeneration, genotoxicity, and oxidative status in multiple organs of rats exposed to cadmium. *European Journal of Cancer Prevention*, 27(1), 70–81.
<https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000273>
- Gomberg, M. (1900). Triphenylmethyl, ein Fall von dreierwerthigem Kohlenstoff. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 33(3), 3150–3163.
<https://doi.org/10.1002/CBER.19000330369>
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., & Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 126–131.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001>
- Gómez-Míguez, M. J., González-Miret, M. L., Hernanz, D., Fernández, M. Á., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 238–245. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.09.021>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karterolioti, H., Georgadakis, S., Kerasioti, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L., Statiri, A., Tsioutsouliti, A., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial

- cells. *Human & Experimental Toxicology*, 33(11), 1099–1112.
<https://doi.org/10.1177/0960327114533575>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Housmekeridou, A., Karapoulou, C., Kerasioti, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2015). Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(2), 433–441.
<https://doi.org/10.3892/IJMM.2015.2246>
- Goutzourelas, N., Stagos, D., Spanidis, Y., Liosi, M., Apostolou, A., Priftis, A., Haroutounian, S., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2015). Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5846–5856.
<https://doi.org/10.3892/MMR.2015.4216>
- Granzotto, A., & Zatta, P. (2014a). Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(MAY).
<https://doi.org/10.3389/FNAGI.2014.00095>
- Granzotto, A., & Zatta, P. (2014b). Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(MAY).
<https://doi.org/10.3389/FNAGI.2014.00095>
- Gruhlke, M. C. H., & Slusarenko, A. J. (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry : PPB*, 59, 98–107.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2012.03.016>
- Grundler, F., Mesnage, R., Goutzourelas, N., Tekos, F., Makri, S., Brack, M., Kouretas, D., & Wilhelmi de Toledo, F. (2020). Interplay between oxidative damage, the redox status, and metabolic biomarkers during long-term fasting. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 145.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111701>
- Gugliandolo, A., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Activation of Nrf2 by Natural Bioactive Compounds: A Promising Approach for Stroke? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–44. <https://doi.org/10.3390/IJMS21144875>
- Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. I., Oktay, M., & Büyükokuroğlu, M. E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2–3), 205–215.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.028>

- Gurr, M. I. (1992). Wine and coronary heart disease. *Lancet (London, England)*, 340(8814), 313. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1353231>
- Gutiérrez, I. H., Lorenzo, E. S. P., & Espinosa, A. V. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92(2), 269–283. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.07.023>
- Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26030718>
- Guzzo, G., Sciacovelli, M., Bernardi, P., Rasola, A., Guzzo, G., Sciacovelli, M., Bernardi, P., & Rasola, A. (2014). Inhibition of succinate dehydrogenase by the mitochondrial chaperone TRAP1 has anti-oxidant and anti-apoptotic effects on tumor cells. *Oncotarget*, 5(23), 11897–11908. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2472>
- Halliwel, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NU.16.070196.000341>
- Halliwel, B. (2005). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *ELS*. <https://doi.org/10.1038/NPG.ELS.0003913>
- Halliwel, B. (2015). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *ELS*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0002269.PUB3>
- Halliwel, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radicals in Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780198717478.001.0001>
- Halliwel, B., Gutteridge, J. M. C., & Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215–219. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90222-3)
- Hampton, M. B., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), 3007–3017. https://doi.org/10.1182/BLOOD.V92.9.3007.421K47_3007_3017
- Han, G., Ugliano, M., Currie, B., Vidal, S., Diéval, J. B., & Waterhouse, A. L. (2015). Influence of closure, phenolic levels and microoxygenation on Cabernet Sauvignon wine composition after 5 years’ bottle storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 36–43. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6694>

- Handan, B. A., de Moura, C. F. G., Cardoso, C. M., Santamarina, A. B., Pisani, L. P., & Ribeiro, D. A. (2020). Protective Effect of Grape and Apple Juices against Cadmium Intoxication in the Kidney of Rats. *Drug Research*, 70(11), 503–511. <https://doi.org/10.1055/a-1221-4733>
- Hanniman, E. A., & Sinal, C. J. (2005). Hormesis. *Encyclopedia of Toxicology*, 529–532. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00492-0>
- Hansen, A. S., Marckmann, P., Dragsted, L. O., Finné Nielsen, I. L., Nielsen, S. E., & Grønbæk, M. (2005). Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(3), 449–455. <https://doi.org/10.1038/SJ.EJCN.1602107>
- Harwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Hashemzaei, M., Tabrizian, K., Alizadeh, Z., Pasandideh, S., Rezaee, R., Mamoulakis, C., Tsatsakis, A., Skaperda, Z., Kouretas, D., & Shahraki, J. (2020). Resveratrol, curcumin and gallic acid attenuate glyoxal-induced damage to rat renal cells. *Toxicology Reports*, 7, 1571–1577. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2020.11.008>
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2014.02.002>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1–23. <https://doi.org/10.3390/IJMS21134777>
- He, S., Sun, C., & Pan, Y. (2008). Red Wine Polyphenols for Cancer Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(5), 842. <https://doi.org/10.3390/IJMS9050842>
- Heiss, E. H., Schachner, D., Zimmermann, K., & Dirsch, V. M. (2013). Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression. *Redox Biology*, 1(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.06.001>
- Hep G2 [HEPG2] - HB-8065 / ATCC. (n.d.). Retrieved January 27, 2023, from <https://www.atcc.org/products/hb-8065>

- Hernández-Camacho, J. D., Bernier, M., López-Lluch, G., & Navas, P. (2018). Coenzyme Q10 supplementation in aging and disease. *Frontiers in Physiology*, 9(FEB), 44. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00044/BIBTEX>
- Hix, S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., & Augusto, O. (2000). In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chemical Research in Toxicology*, 13(10), 1056–1064. <https://doi.org/10.1021/TX000130L>
- Hofbrucker-MacKenzie, S. A., Sivaprakasam, I., Ji, Y., Kessels, M. M., & Qualmann, B. (2019). Neuronal Stress and Its Hormetic Aspects. *The Science of Hormesis in Health and Longevity*, 171–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814253-0.00015-2>
- Homma, N., Tamura, G., Honda, T., Matsumoto, Y., Nishizuka, S., Kawata, S., & Motoyama, T. (2006). Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Science*, 97(1), 51–56. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2005.00133.X>
- Hong, Y., Wang, Z., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2021). High-Throughput Screening and Characterization of Phenolic Compounds in Stone Fruits Waste by LC-ESI-QTOF-MS/MS and Their Potential Antioxidant Activities. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10020234>
- Hoveyda, N., Heneghan, C., Mahtani, K. R., Perera, R., Roberts, N., & Glasziou, P. (2009). A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-9-15>
- How Red Wine Is Made | Wine Enthusiast*. (n.d.). Retrieved January 29, 2023, from <https://www.winemag.com/2019/10/08/how-red-wine-is-made/>
- How White Wine Is Made | Wine Enthusiast Magazine*. (n.d.). Retrieved January 29, 2023, from <https://www.winemag.com/2019/09/24/how-white-wine-is-made/>
- Howes, M. J. R., & Simmonds, M. S. J. (2014). The role of phytochemicals as micronutrients in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 17(6), 558–566. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000115>
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191–196. <https://doi.org/10.1038/NATURE01960>

- Hrelia, S., di Renzo, L., Bavaresco, L., Bernardi, E., Malaguti, M., & Giacosa, A. (2023). Moderate Wine Consumption and Health: A Narrative Review. *Nutrients*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/nu15010175>
- Huang, J. J., Liu, X., Wang, X. Q., Yang, L. H., Qi, D. S., & Yao, R. Q. (2012). [Effects of quercetin on the learning and memory ability of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 14(6), 454–457. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22738455/>
- Huang, S., Yang, N., Liu, Y., Hu, L., Zhao, J., Gao, J., Li, Y., Li, C., Zhang, X., & Huang, T. (2012). Grape seed proanthocyanidins inhibit angiogenesis via the downregulation of both vascular endothelial growth factor and angiopoietin signaling. *Nutrition Research*, 32(7), 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.05.012>
- Hubbard, B. P., Gomes, A. P., Dai, H., Li, J., Case, A. W., Considine, T., Riera, T. v., Lee, J. E., Yen E, S., Lamming, D. W., Pentelute, B. L., Schuman, E. R., Stevens, L. A., Ling, A. J. Y., Armour, S. M., Michan, S., Zhao, H., Jiang, Y., Sweitzer, S. M., ... Sinclair, D. A. (2013). Evidence for a Common Mechanism of SIRT1 Regulation by Allosteric Activators. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6124), 1216. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1231097>
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4), 279–284. <https://doi.org/10.1038/SJ.GENE.6364190>
- Hungin, A. P. S., Mulligan, C., Pot, B., Whorwell, P., Agréus, L., Fracasso, P., Lionis, C., Mendive, J., Philippart De Foy, J. M., Rubin, G., Winchester, C., & de Wit, N. (2013). Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice -- an evidence-based international guide. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 38(8), 864–886. <https://doi.org/10.1111/APT.12460>
- Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., & McCord, J. M. (2011). Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4–6), 234–246. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2011.10.006>
- Hyma, K. E., & Fay, J. C. (2013). Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards. *Molecular Ecology*, 22(11), 2917. <https://doi.org/10.1111/MEC.12155>

- Iciek, M., Kowalczyk-Pachel, D., Bilska-Wilkosz, A., Kwiecién, I., Górny, M., & Włodek, L. (2016). S-sulphydration as a cellular redox regulation. *Bioscience Reports*, 36(2). <https://doi.org/10.1042/BSR20150147>
- Iervolino, M., Lepore, E., Forte, G., Laganà, A. S., Buzzaccarini, G., & Unfer, V. (2021). Natural Molecules in the Management of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): An Analytical Review. *Nutrients*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/NU13051677>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.AJME.2017.09.001>
- Imai, S. I. (2007). Is Sirt1 a miracle bullet for longevity? *Aging Cell*, 6(6), 735–737. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00344.x>
- Inoue, K., Morikawa, T., Takahashi, M., Yoshida, M., & Ogawa, K. (2013). A 13-week subchronic toxicity study of grape skin extract in F344 rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38(4), 559–570. <https://doi.org/10.2131/JTS.38.559>
- Ivanova, V., Vojnoski, B., & Stefova, M. (2012). Effect of winemaking treatment and wine aging on phenolic content in Vranec wines. *Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 161. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0279-2>
- Jacob Filho, W., Lima, C. C., Paunksnis, M. R. R., Silva, A. A., Perilhão, M. S., Caldeira, M., Bocalini, D., & de Souza, R. R. (2018). Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. *The Aging Male : The Official Journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, 21(2), 145–148. <https://doi.org/10.1080/13685538.2017.1350156>
- Jacobs, D. M., Fuhrmann, J. C., van Dorsten, F. A., Rein, D., Peters, S., van Velzen, E. J. J., Hollebrands, B., Draijer, R., van Duynhoven, J., & Garczarek, U. (2012). Impact of short-term intake of red wine and grape polyphenol extract on the human metabolome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3078–3085. <https://doi.org/10.1021/JF2044247>
- Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak, G., Abranko, L., Koellensperger, G., & Hann, S. (2010). LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry*, 122(1), 366–372. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.02.053>
- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62(3), 231–236. <https://doi.org/10.1080/003655102317475498>

- Janega, P., Klimentová, J., Barta, A., Kováčsová, M., Vranková, S., Cebová, M., Čierna, Z., Matúšková, Z., Jakovljevic, V., & Pechánová, O. (2014). Red wine extract decreases pro-inflammatory markers, nuclear factor- κ B and inducible NOS, in experimental metabolic syndrome. *Food & Function*, 5(9), 2202–2207. <https://doi.org/10.1039/C4FO00097H>
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. v., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5297), 218–220. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5297.218>
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., & Trollat, P. (1995). Resveratrol Content of Wines of Different Ages: Relationship With Fungal Disease Pressure in the Vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 1–4. <https://doi.org/10.5344/AJEV.1995.46.1.1>
- Ji, Q., Liu, X., Han, Z., Zhou, L., Sui, H., Yan, L., Jiang, H., Ren, J., Cai, J., & Li, Q. (2015). Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1119-y>
- Jiménez-Girón, A., Ibáñez, C., Cifuentes, A., Simó, C., Muñoz-González, I., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Victoria Moreno-Arribas, V. (2015). Faecal metabolomic fingerprint after moderate consumption of red wine by healthy subjects. *Journal of Proteome Research*, 14(2), 897–905. <https://doi.org/10.1021/PR500960G>
- Jiménez-Girón, A., Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Muñoz-González, I., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Martín-Álvarez, P. J., Murri, M., Tinahones, F. J., Andrés-Lacueva, C., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). Comparative study of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after intake of gin, red wine, and dealcoholized red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3909–3915. <https://doi.org/10.1021/JF400678D>
- Johnson, W. D., Morrissey, R. L., Osborne, A. L., Kapetanovic, I., Crowell, J. A., Muzzio, M., & McCormick, D. L. (2011). Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(12), 3319–3327. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.08.023>

- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87.
<https://doi.org/10.1016/J.TOX.2011.03.001>
- Jones, D. P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *https://Home.Liebertpub.Com/Ars*, 8(9–10), 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ARS.2006.8.1865>
- Juan, C. A., de la Lastra, J. M. P., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 4642, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094642>
- Kafantaris, I., Kotsampasi, B., Christodoulou, V., Kokka, E., Kouka, P., Terzopoulou, Z., Gerasopoulos, K., Stagos, D., Mitsagga, C., Giavasis, I., Makri, S., Petrotos, K., & Kouretas, D. (2017). Grape pomace improves antioxidant capacity and faecal microflora of lambs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(5), e108–e121. <https://doi.org/10.1111/JPN.12569>
- Kafantaris, I., Kotsampasi, B., Christodoulou, V., Makri, S., Stagos, D., Gerasopoulos, K., Petrotos, K., Goulas, P., & Kouretas, D. (2018). Effects of Dietary Grape Pomace Supplementation on Performance, Carcass Traits and Meat Quality of Lambs. *In Vivo (Athens, Greece)*, 32(4), 807–812.
<https://doi.org/10.21873/INVIVO.11311>
- Kafantaris, I., Stagos, D., Kotsampasi, B., Hatzis, A., Kypriotakis, A., Gerasopoulos, K., Makri, S., Goutzourelas, N., Mitsagga, C., Giavasis, I., Petrotos, K., Kokkas, S., Goulas, P., Christodoulou, V., & Kouretas, D. (2018). Grape pomace improves performance, antioxidant status, fecal microbiota and meat quality of piglets. *Animal*, 12(2), 246–255. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001604>
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I. S., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., & Psarra, E. (2001). Instrumental and sensory analysis of Greek wines; Implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry*, 73(4), 501–514. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00327-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00327-7)
- Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E., & Lanaridis, P. (2006). Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 99(4), 784–793.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.07.059>
- Kamat, P. K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C., & Tyagi, N. (2016). Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of

- Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 648–661. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9053-6>
- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling*, 11(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00037-0)
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4360–4367. <https://doi.org/10.1021/JF049613B>
- Kang, S. W., Lee, S., & Lee, E. K. (2015). ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. *Archives of Pharmacal Research*, 38(3), 338–345. <https://doi.org/10.1007/S12272-015-0550-6>
- Karalis, F., Soubasi, V., Georgiou, T., Nakas, C. T., Simeonidou, C., Guiba-Tziampiri, O., & Spandou, E. (2011). Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain Research*, 1425, 98–110. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.09.044>
- Karydas, C., Iatrou, M., Kouretas, D., Patouna, A., Iatrou, G., Lazos, N., Gewehr, S., Tseni, X., Tekos, F., Zartaloudis, Z., Mainos, E., & Mourelatos, S. (2020). Prediction of Antioxidant Activity of Cherry Fruits from UAS Multispectral Imagery Using Machine Learning. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9020156>
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 47(9), 1304–1309. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.07.035>
- Kaur, M., Agarwal, C., & Agarwal, R. (2009). Anticancer and Cancer Chemopreventive Potential of Grape Seed Extract and Other Grape-Based Products. *The Journal of Nutrition*, 139(9), 1806S. <https://doi.org/10.3945/JN.109.106864>
- Keevil, J. G., Osman, H. E., Reed, J. D., & Folts, J. D. (2000). Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *The Journal of Nutrition*, 130(1), 53–56. <https://doi.org/10.1093/JN/130.1.53>
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akçay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143. <https://doi.org/10.1017/S0317167100052823>

- Kelley, E. E., Buettner, G. R., & Burns, C. P. (1995). Relative α -tocopherol deficiency in cultured-cells: Free radical-mediated lipid peroxidation, lipid oxidizability, and cellular polyunsaturated fatty acid content. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319(1), 102–109. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1271>
- Kerasioti, E., Stagos, D., Jamurtas, A., Kiskini, A., Koutedakis, Y., Goutzourelas, N., Pournaras, S., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2013). Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate-whey protein cake after exhaustive cycling in humans. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, 42–46. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.01.023>
- Kerasioti, E., Terzopoulou, Z., Komini, O., Kafantaris, I., Makri, S., Stagos, D., Gerasopoulos, K., Anisimov, N. Y., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2017). Tissue specific effects of feeds supplemented with grape pomace or olive oil mill wastewater on detoxification enzymes in sheep. *Toxicology Reports*, 4, 364–372. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2017.06.007>
- Kerasioti, E., Veskokis, A., Virgiliou, C., Theodoridis, G., Taitzoglou, I., & Kouretas, D. (2019). The Strong Antioxidant Sheep/Goat Whey Protein Protects Against mTOR Overactivation in Rats: A Mode of Action Mimicking Fasting. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8030071>
- Keum, Y. S., & Choi, B. Y. (2014). Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(7), 10074–10089. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES190710074>
- Kilmartin, P. A., Zou, H., & Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1957–1965. <https://doi.org/10.1021/JF001044U>
- Kim, C. W., Hwang, K. A., & Choi, K. C. (2016). Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 23(14), 1787–1796. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2016.10.016>
- Kontaxakis, E., Atzemopoulos, A., Alissandrakis, E., Ververidis, F., & Trantas, E. (2022). Evolution of Physicochemical Properties and Phenolic Maturity of Vilana, Vidiano, Kotsifali and Mandilari Wine Grape Cultivars (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/plants11243547>

- Kontoghiorghes, G. J., & Kontoghiorghes, C. N. (2019). Prospects for the introduction of targeted antioxidant drugs for the prevention and treatment of diseases related to free radical pathology. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 28(7), 593–603. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1631284>
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/NU12020457>
- Koren, H. S. (1995). Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environmental Health Perspectives*, 103(SUPPL. 6), 235–242. <https://doi.org/10.1289/EHP.95103S6235>
- Korge, P., Calmettes, G., & Weiss, J. N. (2015). Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(6–7), 514–525. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2015.02.012>
- Kouka, P., Tekos, F., Valta, K., Mavros, P., Veskoukis, A. S., Angelis, A., Skaltsounis, A. L., & Kouretas, D. (2019). Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. *Oncology Reports*, 42(6), 2814–2825. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7386>
- Kouka, P., Tsakiri, G., Tzortzi, D., Dimopoulou, S., Sarikaki, G., Stathopoulos, P., Veskoukis, A. S., Halabalaki, M., Skaltsounis, A. L., & Kouretas, D. (2019). The polyphenolic composition of extracts derived from different Greek extra virgin olive oils is correlated with their antioxidant potency. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1870965>
- Kumar, H., Kim, I. S., More, S. V., Kim, B. W., & Choi, D. K. (2014). Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Natural Product Reports*, 31(1), 109–139. <https://doi.org/10.1039/C3NP70065H>
- Kwon, W., & Constantinides, P. (2017). Ideology and Moral Reasoning: How wine was saved from the 19th century phylloxera epidemic. <https://doi.org/10.1177/0170840617708006>, 39(8), 1031–1053. <https://doi.org/10.1177/0170840617708006>
- Kyriazis, I. D., Skaperda, Z., Tekos, F., Makri, S., Vardakas, P., Vassi, E., Patouna, A., Terizi, K., Angelakis, C., & Kouretas, D. (2021). Methodology for the biofunctional assessment of honey (Review). *International Journal of Functional Nutrition*, 2(2), 1–11. <https://doi.org/10.3892/IJFN.2021.15>
- KYRIAZIS, I. D., Vassi, E., Alvanou, M., Angelakis, C., Skaperda, Z., TEKOS, F., Garikipati, V. N. S., SPANDIDOS, D. A., & Kouretas, D. (2022). The impact of diet

- upon mitochondrial physiology (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 50(5). <https://doi.org/10.3892/IJMM.2022.5191>
- la Torre, G. L., Saitta, M., Vilasi, F., Pellicanò, T., & Dugo, G. (2006). Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chemistry*, 94(4), 640–650. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.02.007>
- Lamb, R., Fiorillo, M., Chadwick, A., Ozsvari, B., Reeves, K. J., Smith, D. L., Clarke, R. B., Howell, S. J., Cappello, A. R., Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagès, M., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2015). Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells: Implications for more effective radiation therapy. *Oncotarget*, 6(16), 14005. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4159>
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2015). A High-Throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 7890-7914, 20(5), 7890–7914. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES20057890>
- Landrault, N., Poucheret, P., Azay, J., Krosniak, M., Gasc, F., Jenin, C., Cros, G., & Teissedre, P. L. (2002). Effect of a Polyphenols-Enriched Chardonnay White Wine in Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 311–318. <https://doi.org/10.1021/JF020219S>
- Larrauri, J. A., Sánchez-Moreno, C., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity in the aging of selected red spanish wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1603–1606. <https://doi.org/10.1021/jf980607n>
- Lawrenz, M. B., Derek Pechous, R., Allen, L.-A. H., Bourret, T., Mecsas, J., Nguyen, G. T., & Green, E. R. (2017). Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance Activation and Inhibition of NADPH Oxidase. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | *Www.Frontiersin.Org*, 1, 373. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- Lazarakis, Konstantinos. (2005). *The wines of Greece*. 486.
- le Gal, K., Schmidt, E. E., & Sayin, V. I. (2021). Cellular Redox Homeostasis. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 1377, 10(9), 1377. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091377>
- Lee, G. A., Hwang, K. A., & Choi, K. C. (2016). Roles of dietary phytoestrogens on the regulation of epithelial-mesenchymal transition in diverse cancer metastasis. *Toxins*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/toxins8060162>

- Lee, S.-J., Choi, S.-K., & Seo, J.-S. (2009). Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. *Nutrition Research and Practice*, 3(4), 279–285.
<https://doi.org/10.4162/NRP.2009.3.4.279>
- Leinonen, H. M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M., & Levonen, A. L. (2014). Role of the keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Advances in Cancer Research*, 122, 281–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00008-6>
- Leonard, S. S., Harris, G. K., & Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(12), 1921–1942.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.09.010>
- Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L., & Stadtman, E. R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development*, 107(3), 323–332.
[https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00152-3)
- Levine, R., Moskovitz, J., & Stadtman, E. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*, 50(4–5), 301–307. <https://doi.org/10.1080/713803735>
- Li, C., Zhang, L., Qiu, Z., Deng, W., & Wang, W. (2022). Key Molecules of Fatty Acid Metabolism in Gastric Cancer. *Biomolecules* 2022, Vol. 12, Page 706, 12(5), 706.
<https://doi.org/10.3390/BIOM12050706>
- Li, J., Chong, T., Wang, Z., Chen, H., Li, H., Cao, J., Zhang, P., & Li, H. (2014). A novel anti-cancer effect of resveratrol: Reversal of epithelial- mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 10(4), 1717–1724.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2417>
- Li, L., Luo, W., Qian, Y., Zhu, W., Qian, J., Li, J., Jin, Y., Xu, X., & Liang, G. (2019). Luteolin protects against diabetic cardiomyopathy by inhibiting NF-κB-mediated inflammation and activating the Nrf2-mediated antioxidant responses. *Phytomedicine*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.034>
- Li, L., & Sun, B. (2019). Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 563–579.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1381071>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>

- Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. v. (2016). From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208, 228–238.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.009>
- Lismont, C., Revenco, I., & Fransen, M. (2019). Peroxisomal hydrogen peroxide metabolism and signaling in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153673>
- Littarru, G. P., & Tiano, L. (2007). Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Molecular Biotechnology*, 37(1), 31–37.
<https://doi.org/10.1007/S12033-007-0052-Y>
- Lluís, L., Muñoz, M., Rosa Nogués, M., Sánchez-Martos, V., Romeu, M., Giralt, M., Valls, J., & Solà, R. (2011). Toxicology evaluation of a procyanidin-rich extract from grape skins and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1450–1454.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.042>
- Lo, S. C., Li, X., Henzl, M. T., Beamer, L. J., & Hannink, M. (2006). Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *The EMBO Journal*, 25(15), 3605–3617. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7601243>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Longhi, S. J., Martín, M. C., Fontana, A., & de Ambrosini, V. I. M. (2022). Different approaches to supplement polysaccharide-degrading enzymes in vinification: Effects on color extraction, phenolic composition, antioxidant activity and sensory profiles of Malbec wines. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 157. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111447>
- López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., & Valle-Ribes, C. del. (2003). The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 233–244.
<https://doi.org/10.1080/10408690390826509>
- Lu, S. C. (2013). GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3143. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.09.008>
- Lucas, D. L., Brown, R. A., Wassef, M., & Giles, T. D. (2005). Alcohol and the cardiovascular system: research challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(12), 1916–1924.
<https://doi.org/10.1016/J.JACC.2005.02.075>

- Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Zhang, Y., Abramov, A. Y., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *The Biochemical Journal*, 457(3), 415–424. <https://doi.org/10.1042/BJ20130863>
- Lukić, I., Jedrejčić, N., Ganić, K. K., Staver, M., & Peršurić, D. (2015). Phenolic and Aroma Composition of White Wines Produced by Prolonged Maceration and Maturation in Wooden Barrels. *Food Technology and Biotechnology*, 53(4), 407. <https://doi.org/10.17113/FTB.53.04.15.4144>
- Lukić, I., Radeka, S., Budić-Leto, I., Bubola, M., & Vrhovsek, U. (2019). Targeted UPLC-QqQ-MS/MS profiling of phenolic compounds for differentiation of monovarietal wines and corroboration of particular varietal typicity concepts. *Food Chemistry*, 300, 125251. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125251>
- Luo, C., Wei, X., Song, J., Xu, X., Huang, H., Fan, S., Zhang, D., Han, L., & Lin, J. (2022). Interactions between Gut Microbiota and Polyphenols: New Insights into the Treatment of Fatigue. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21), 7377. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27217377>
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 401–426. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-011112-140320>
- Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. v, ... ح, فاطمی. (2012). Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines. *Anticancer Research*, 32(12), 5371–5377. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Magalhães, B., Bastos, J., & Lunet, N. (2011). Dietary patterns and colorectal cancer: a case-control study from Portugal. *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 20(5), 389–395. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0B013E328347220A>
- Magnani, F., & Mattevi, A. (2019). Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2019.03.001>
- Mailloux, R. J. (2020). An update on mitochondrial reactive oxygen species production. *Antioxidants*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9060472>

- Makri, S., Kafantaris, I., Stagos, D., Chamokeridou, T., Petrotos, K., Gerasopoulos, K., Mpesios, A., Goutzourelas, N., Kokkas, S., Goulas, P., Komiotis, D., & Kouretas, D. (2017). Novel feed including bioactive compounds from winery wastes improved broilers' redox status in blood and tissues of vital organs. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 102, 24–31.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.01.019>
- Margaritelis, N. v., Cobley, J. N., Paschalis, V., Veskoukis, A. S., Theodorou, A. A., Kyparos, A., & Nikolaidis, M. G. (2016). Going retro: Oxidative stress biomarkers in modern redox biology. *Free Radical Biology & Medicine*, 98, 2–12.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.02.005>
- Margaritelis, N. v., Kyparos, A., Paschalis, V., Theodorou, A. A., Panayiotou, G., Zafeiridis, A., Dipla, K., Nikolaidis, M. G., & Vrabas, I. S. (2014). Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox Biology*, 2(1), 520–528.
<https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2014.02.003>
- Margaritelis, N. v., Theodorou, A. A., Paschalis, V., Veskoukis, A. S., Dipla, K., Zafeiridis, A., Panayiotou, G., Vrabas, I. S., Kyparos, A., & Nikolaidis, M. G. (2018). Adaptations to endurance training depend on exercise-induced oxidative stress: exploiting redox interindividual variability. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 222(2). <https://doi.org/10.1111/APHA.12898>
- Margaritelis, N. v., Veskoukis, A. S., Paschalis, V., Vrabas, I. S., Dipla, K., Zafeiridis, A., Kyparos, A., & Nikolaidis, M. G. (2015). Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 20(2), 97–108.
<https://doi.org/10.3109/1354750X.2014.1002807>
- Margină, D., Ungurianu, A., Purdel, C., Nițulescu, G. M., Tsoukalas, D., Sarandi, E., Thanasoula, M., Burykina, T. I., Tekos, F., Buha, A., Nikitovic, D., Kouretas, D., & Tsatsakis, A. M. (2020a). Analysis of the intricate effects of polyunsaturated fatty acids and polyphenols on inflammatory pathways in health and disease. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 143.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111558>
- Margină, D., Ungurianu, A., Purdel, C., Nițulescu, G. M., Tsoukalas, D., Sarandi, E., Thanasoula, M., Burykina, T. I., Tekos, F., Buha, A., Nikitovic, D., Kouretas, D., & Tsatsakis, A. M. (2020b). Analysis of the intricate effects of polyunsaturated fatty acids and polyphenols on inflammatory pathways in health and disease. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British*

- Industrial Biological Research Association*, 143.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111558>
- Margină, D., Ungurianu, A., Purdel, C., Tsoukalas, D., Sarandi, E., Thanasoula, M., Tekos, F., Mesnage, R., Kouretas, D., & Tsatsakis, A. (2020). Chronic Inflammation in the Context of Everyday Life: Dietary Changes as Mitigating Factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 1–30. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17114135>
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *The FEBS Journal*, 275(15), 3959–3970. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2008.06542.X>
- Martín, S., González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2011). Neuroprotective properties of Spanish red wine and its isolated polyphenols on astrocytes. *Food Chemistry*, 128(1), 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.074>
- Martín, S., González-Burgos, E., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2013). Protective effects of Merlot red wine extract and its major polyphenols in PC12 cells under oxidative stress conditions. *Journal of Food Science*, 78(1).
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12000>
- Martínez-Huélamo, M., Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., & de la Torre, R. (2017). Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX6040073>
- Mattson, M. P. (2008). Dietary factors, hormesis and health. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2007.08.004>
- Maumi, B. F., Bessis, R., & Sbaghi, M. (2007). Analysis of resveratrol in Burgundy wines. <http://Dx.Doi.Org/10.1080/09571269308717954>, 4(2), 79–85.
<https://doi.org/10.1080/09571269308717954>
- Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Lopez-Burillo, S., & Reiter, R. J. (2003). Oxidative damage to catalase induced by peroxyl radicals: Functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Research*, 37(5), 543–553.
<https://doi.org/10.1080/1071576031000083206>
- McGovern, P. E., Fleming, S. J. (Stuart J., & Katz, S. H. (1996). *The origins and ancient history of wine*. Gordon and Breach Publishers.
<https://www.routledge.com/The-Origins-and-Ancient-History-of-Wine-Food-and-Nutrition-in-History-and/McGovern-Fleming-Katz/p/book/9789056995522>

- Melidou, M., Riganakos, K., & Galaris, D. (2005). Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(12), 1591–1600.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.08.009>
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., & Kassie, F. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198(1–3), 329–340.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.009>
- Messeri, G. (1995). Non-isotopic vs isotopic immunoassay: is white wine “alternative” to the red? *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine : Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, 39(4), 264–266.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8624787/>
- Mihaljević, Z., Kujundžić, T., Jukić, V., Stupin, A., Drenjančević, M., & Drenjančević, I. (2022). White Wine-Induced Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Sprague-Dawley Rats. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(5).
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX11050944>
- Milsum, J. H. (1985). A model of the eustress system for health/illness. *Behavioral Science*, 30(4), 179–186. <https://doi.org/10.1002/bs.3830300402>
- Mirhadi, E., Roufogalis, B. D., Banach, M., Barati, M., & Sahebkar, A. (2021). Resveratrol: Mechanistic and therapeutic perspectives in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacological Research*, 163.
<https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105287>
- Mitra, S., Tareq, A. M., Das, R., Emran, T. bin, Nainu, F., Chakraborty, A. J., Ahmad, I., Tallei, T. E., Idris, A. M., & Simal-Gandara, J. (2022). Polyphenols: A first evidence in the synergism and bioactivities.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2026376>, 1–23.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2026376>
- Mitrevska, K., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Calokerinos, A. C. (2020). Antioxidant Activity and Polyphenolic Content of North Macedonian Wines. *Applied Sciences* 2020, Vol. 10, Page 2010, 10(6), 2010. <https://doi.org/10.3390/APP10062010>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19.
<https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2016.08.002>
- Mlcek, J., Jurikova, T., Skrovankova, S., & Sochor, J. (2016). Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(5).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES21050623>

- Mobasheri, A., Henrotin, Y., Biesalski, H. K., & Shakibaei, M. (2012). Scientific Evidence and Rationale for the Development of Curcumin and Resveratrol as Nutraceuticals for Joint Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 4202. <https://doi.org/10.3390/IJMS13044202>
- Mohamed Saleem, T. S., & Basha, S. D. (2010). Red wine: A drink to your heart. *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 1(4), 171. <https://doi.org/10.4103/0975-3583.74259>
- Mombouli, J. v., & Vanhoutte, P. M. (1999). Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31(1), 61–74. <https://doi.org/10.1006/JMCC.1998.0844>
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95(3), 405–412. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.01.004>
- Mondal, L. K., Pramanik, S., Chowdhury, S., Bose, C., Bera, D., Saha, A., & Bhattacharjee, K. (2022). Do different lipid components accelerate the pathogenesis and severity of Diabetic Retinopathy? *International Journal of Retina and Vitreous*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/S40942-022-00390-4>
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455(1–2), 29–60. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
- Mortenson, P. N., Erlanson, D. A., de Esch, I. J. P., Jahnke, W., & Johnson, C. N. (2018). Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2017. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(8), 3857–3872. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.8B01472>
- Mullins, M. G., Bouquet, A., & Williams, L. E. (1992). Biology of the grapevine. *Biology of the Grapevine*.
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3380, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Myrtsi, E. D., Koulocheri, S. D., Iliopoulos, V., & Haroutounian, S. A. (2021). High-Throughput Quantification of 32 Bioactive Antioxidant Phenolic Compounds in Grapes, Wines and Vinification Byproducts by LC–MS/MS. *Antioxidants*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10081174>

- Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Science*, 112(10), 3945–3952. <https://doi.org/10.1111/CAS.15068>
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2018). Effect of Sulfites on Antioxidant Activity, Total Polyphenols, and Flavonoid Measurements in White Wine. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/FOODS7030035>
- Nash, V., Ranadheera, C. S., Georgousopoulou, E. N., Mellor, D. D., Panagiotakos, D. B., McKune, A. J., Kellett, J., & Naumovski, N. (2018). The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review. *Food Research International*, 113, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.019>
- Nauseef, W. M. (2014). Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cellular Microbiology*, 16(8), 1146–1155. <https://doi.org/10.1111/cmi.12312>
- Nemzer, B., Kalita, D., Yashin, A. Y., & Yashin, Y. I. (2021). Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health—A Review. *Beverages* 2022, Vol. 8, Page 1, 8(1), 1. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES8010001>
- Nepka, C., Asprodini, E., & Kouretas, D. (1999). Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 24(2), 183–189. <https://doi.org/10.1007/BF03190367>
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, 302(2), 71–83. <https://doi.org/10.1007/S00403-009-1001-3>
- Niki, E. (2007a). [Eustress and distress]. *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, 129(2), 76–79. <https://doi.org/10.1254/FPJ.129.76>
- Niki, E. (2007b). Vitamin E function. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(10), 1466–1467. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.016>
- Niki, E. (2016). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 19–24. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2015.11.017>
- Nita, M., & Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults.

- Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/3164734>
- Niture, S. K., Kaspar, J. W., Shen, J., & Jaiswal, A. K. (2010). Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244(1), 37–42.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.06.009>
- Niture, S. K., Khatri, R., & Jaiswal, A. K. (2014). Regulation of Nrf2 - An update. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>
- Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinmei, M., & Packer, L. (1997). Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 42(1), 35–44.
<https://doi.org/10.1080/15216549700202411>
- Nordgren, M., & Fransen, M. (2014). Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie*, 98(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.026>
- Nunes, C., Teixeira, N., Serra, D., Freitas, V., Almeida, L., & Laranjinha, J. (2016). Red wine polyphenol extract efficiently protects intestinal epithelial cells from inflammation via opposite modulation of JAK/STAT and Nrf2 pathways. *Toxicology Research*, 5(1), 53. <https://doi.org/10.1039/C5TX00214A>
- Oberley, L. W., & Spitz, D. R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in Enzymology*, 105(C), 457–464.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05064-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05064-3)
- Ohishi, T., Fukutomi, R., Shoji, Y., Goto, S., & Isemura, M. (2021). The Beneficial Effects of Principal Polyphenols from Green Tea, Coffee, Wine, and Curry on Obesity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26020453>
- Ohishi, T., Hayakawa, S., & Miyoshi, N. (2022). Involvement of microRNA modifications in anticancer effects of major polyphenols from green tea, coffee, wine, and curry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2038540>
- Oliveira-Alves, S., Lourenço, S., Anjos, O., Fernandes, T. A., Caldeira, I., Catarino, S., & Canas, S. (2021). Influence of the Storage in Bottle on the Antioxidant Activities and Related Chemical Characteristics of Wine Spirits Aged with Chestnut Staves and Micro-Oxygenation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(1).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27010106>

- Opie, L. H., & Lecour, S. (2007). The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *European Heart Journal*, 28(14), 1683–1693.
<https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHM149>
- Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/nu8020078>
- Pace-Asciak, C. R., Rounova, O., Hahn, S. E., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1996). Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clinica Chimica Acta*, 246(1–2), 163–182.
[https://doi.org/10.1016/0009-8981\(96\)06236-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(96)06236-5)
- Packer, L. (2002). Highlight: Oxidative stress. *Biological Chemistry*, 383(3–4), 345.
<https://doi.org/10.1515/BC.2002.039>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Panieri, E., Buha, A., Telkoparan-akillilar, P., Cevik, D., Kouretas, D., Veskoukis, A., Skaperda, Z., Tsatsakis, A., Wallace, D., Suzen, S., & Saso, L. (2020). Potential Applications of NRF2 Modulators in Cancer Therapy. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9030193>
- Panieri, E., & Santoro, M. M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death & Disease*, 7(6).
<https://doi.org/10.1038/CDDIS.2016.105>
- Panieri, E., Telkoparan-Akillilar, P., Suzen, S., & Saso, L. (2020). The nrf2/keap1 axis in the regulation of tumor metabolism: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Biomolecules*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/biom10050791>
- Panza, F., Frisardi, V., Seripa, D., Logroscino, G., Santamato, A., Imbimbo, B. P., Scafato, E., Pilotto, A., & Solfrizzi, V. (2012). Alcohol consumption in mild cognitive impairment and dementia: harmful or neuroprotective? *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 27(12), 1218–1238.
<https://doi.org/10.1002/GPS.3772>
- Pascual-Serrano, A., Bladé, C., Suárez, M., & Arola-Arnal, A. (2018). Grape Seed Proanthocyanidins Improve White Adipose Tissue Expansion during Diet-Induced Obesity Development in Rats. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 2632, 19(9), 2632.
<https://doi.org/10.3390/IJMS19092632>

- Patel, R., Rinker, L., Peng, J., Chilian, W. M., Patel, R., Rinker, L., Peng, J., & Chilian, W. M. (2017). Reactive Oxygen Species: The Good and the Bad. *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.71547>
- Pati, S., Crupi, P., Savastano, M. L., Benucci, I., & Esti, M. (2020). Evolution of phenolic and volatile compounds during bottle storage of a white wine without added sulfite. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 775–784. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10084>
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.080>
- Pehlivan, F. E. (2017). Vitamin C: An Antioxidant Agent. *Vitamin C*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.69660>
- Perdrizet, G. A. (1997). Hans Selye and beyond: responses to stress. *Cell Stress & Chaperones*, 2(4), 214. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1997\)002<0214:hsabrt>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1997)002<0214:hsabrt>2.3.co;2)
- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., & Rubio-Ruiz, M. E. (2017). Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS18102098>
- Peri, P., Kamiloglu, S., Capanoglu, E., & Ozcelik, B. (2015). Investigating the Effect of Aging on the Phenolic Content, Antioxidant Activity and Anthocyanins in Turkish Wines. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1845–1853. <https://doi.org/10.1111/JFPP.12420>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11. <https://doi.org/10.1007/S12291-014-0446-0>
- Pires, V. C., Gollücke, A. P. B., Ribeiro, D. A., Lungato, L., D’Almeida, V., & Aguiar, O. (2013). Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: A chronic assay. *British Journal of Nutrition*, 110(11), 2020–2029. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001360>
- Pitoniak, A., & Bohmann, D. (2015). Mechanisms and functions of Nrf2 signaling in *Drosophila*. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Part B), 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.020>

- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D., & Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>
- Porteri, E., Rizzoni, D., de Ciuceis, C., Boari, G. E. M., Platto, C., Pilu, A., Miclini, M., Agabiti Rosei, C., Bulgari, G., & Agabiti Rosei, E. (2010). Vasodilator effects of red wines in subcutaneous small resistance artery of patients with essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, 23(4), 373–378. <https://doi.org/10.1038/AJH.2009.280>
- Powell, K. S., Cooper, P. D., & Forneck, A. (2013). The biology, physiology and host-plant interactions of grape phylloxera *daktulosphaira vitifoliae*. *Advances in Insect Physiology*, 45, 159–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417165-7.00004-0>
- Pozo-Bayón, M. Á., Alcaíde, J. M., Polo, M. C., & Pueyo, E. (2007). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory compounds in white and red wines. *Food Chemistry*, 100(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.007>
- Priftis, A., Panagiotou, E. M., Lakis, K., Plika, C., Halabalaki, M., Ntasi, G., Veskoukis, A. S., Stagos, D., Skaltsounis, L. A., & Kouretas, D. (2018). Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 114, 119–127. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.02.029>
- Priftis, A., Soursou, V., Makiou, A. S., Tekos, F., Veskoukis, A. S., Tsantarliotou, M. P., Taitzoglou, I. A., & Kouretas, D. (2019). A lightly roasted coffee extract improves blood and tissue redox status in rats through enhancement of GSH biosynthesis. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 125, 305–312. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.01.012>
- Qader, M., Xu, J., Yang, Y., Liu, Y., & Cao, S. (2020). Natural Nrf2 Activators from Juices, Wines, Coffee, and Cocoa. *Beverages 2020, Vol. 6, Page 68*, 6(4), 68. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES6040068>

- Qaisiya, M., Coda Zabetta, C. D., Bellarosa, C., & Tiribelli, C. (2014). Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. *Cellular Signalling*, 26(3), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.029>
- Qu, X., Qi, D., Dong, F., Wang, B., Guo, R., Luo, M., & Yao, R. (2014). Quercetin improves hypoxia-ischemia induced cognitive deficits via promoting remyelination in neonatal rat. *Brain Research*, 1553, 31–40. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2014.01.035>
- Quero, J., Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Osada, J., Cerrada, E., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2021). Grape Stem Extracts with Potential Anticancer and Antioxidant Properties. *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 243*, 10(2), 243. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10020243>
- R, L., Z, J., & MA, T. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species (Apex, N.C.)*, 1(1). <https://doi.org/10.20455/ROS.2016.803>
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2005). Exercise and hormesis: Oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*, 6(1), 71–75. <https://doi.org/10.1007/s10522-004-7386-7>
- Radak, Z., Chung, H. Y., & Goto, S. (2008). Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029>
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., & Goto, S. (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2007.04.004>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Ralser, M., & Benjamin, I. J. (2008). Reductive stress on life span extension in *C. elegans*. *BMC Research Notes*, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-19>
- Ramage, M., & Shipp, K. (2020). Ludwig von Bertalanffy. *Systems Thinkers*, 53–62. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-7475-2_6
- Ravanidis, S., Grundler, F., de Toledo, F. W., Dimitriou, E., Tekos, F., Skaperda, Z., Kouretas, D., & Doxakis, E. (2021). Fasting-mediated metabolic and toxicity reprogramming impacts circulating microRNA levels in humans. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British*

- Industrial Biological Research Association*, 152.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.112187>
- Ray, S., Bagchi, D., Lim, P. M., Bagchi, M., Gross, S. M., Kothari, S. C., Preuss, H. G., & Stohs, S. J. (2001). *Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract*.
<https://dspace2.creighton.edu/xmlui/handle/10504/71863>
- Ray, S. D., Farris, F. F., & Hartmann, A. C. (2014). Hormesis. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 944–948. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00398-5>
- Rayo Llerena, I., & Marín Huerta, E. (1998). Wine and the heart. *Revista Espanola de Cardiologia*, 51(6), 435–449. [https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(98\)74772-4](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(98)74772-4)
- Reddy, Y. N., Murthy, S. v, Krishna, D. R., & Prabhakar, M. C. (2004). *Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients*.
<http://imsear.searo.who.int/handle/123456789/148251>
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992a). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet (London, England)*, 339(8808), 1523–1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F)
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992b). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet (London, England)*, 339(8808), 1523–1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F)
- Renaud, S., & Gueguen, R. (1998). The French paradox and wine drinking. *Novartis Foundation Symposium*, 216(216), 208–222.
<https://doi.org/10.1002/9780470515549.CH13>
- Ribas, V., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5 JUL, 151.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2014.00151/BIBTEX>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (n.d.). *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2 nd Edition*. Retrieved January 15, 2023, from www.wiley.com
- Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., & Cuadrado, A. (2019). Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/9372182>

- Rodrigo, R., Rivera, G., Orellana, M., Araya, J., & Bosco, C. (2002). Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sciences*, 71(24), 2881–2895. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02140-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02140-9)
- Romanet, R., Sarhane, Z., Bahut, F., Uhl, J., Schmitt-Kopplin, P., Nikolantonaki, M., & Gougeon, R. D. (2021). Exploring the chemical space of white wine antioxidant capacity: A combined DPPH, EPR and FT-ICR-MS study. *Food Chemistry*, 355. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129566>
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., & Soulti, K. (n.d.). *Scavenging Capacities of Some Wines and Wine Phenolic Extracts*.
- Rudling, A., Gustafsson, R., Almlöf, I., Homan, E., Scobie, M., Warpman Berglund, U., Helleday, T., Stenmark, P., & Carlsson, J. (2017). Fragment-Based Discovery and Optimization of Enzyme Inhibitors by Docking of Commercial Chemical Space. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(19), 8160–8169. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B01006/SUPPL_FILE/JM7B01006_SI_003.ZIP
- Sahpazidou, D., Geromichalos, G. D., Stagos, D., Apostolou, A., Haroutounian, S. A., Tsatsakis, A. M., Tzanakakis, G. N., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicology Letters*, 230(2), 218–224. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2014.01.042>
- Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., & Szekeres, T. (2008). Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research*, 658(1–2), 68–94. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2007.08.004>
- Sajadimajd, S., & Khazaei, M. (2018). Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Current Cancer Drug Targets*, 18(6), 538–557. <https://doi.org/10.2174/1568009617666171002144228>
- Sakkiadi, A. V., Georgiou, C. A., & Haroutounian, S. A. (2007). A Standard Addition Method to Assay the Concentration of Biologically Interesting Polyphenols in Grape Berries by Reversed-Phase HPLC. *Molecules* 2007, Vol. 12, Pages 2259–2269, 12(9), 2259–2269. <https://doi.org/10.3390/12092259>
- Salvi, A., Carrupt, P. A., Tillement, J. P., & Testa, B. (2001). Structural damage to proteins caused by free radicals: Assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochemical Pharmacology*, 61(10), 1237–1242. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00607-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00607-4)

- Santarsiero, A., Convertini, P., Vassallo, A., Santoro, V., Todisco, S., Iacobazzi, D., Fondufe-Mittendorf, Y., Martelli, G., de Oliveira, M. R., Montanaro, R., Brancaleone, V., Stöckl, J., & Infantino, V. (2021). Phenolic Compounds of Red Wine Aglianico del Vulture Modulate the Functional Activity of Macrophages via Inhibition of NF-κB and the Citrate Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5533793>
- Sasaki, M., Ikeda, H., Sato, Y., & Nakanuma, Y. (2008). Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: A culture study. *Free Radical Research*, 42(7), 625–632. <https://doi.org/10.1080/10715760802244768>
- Saucier, C. (2010). How do wine polyphenols evolve during wine ageing? *Cerevisia*, 35(1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/J.CERVIS.2010.05.002>
- Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6), 608–619. <https://doi.org/10.1080/15257770802138558>
- Schleiffer, M., & Speiser, B. (2022). Presence of pesticides in the environment, transition into organic food, and implications for quality assurance along the European organic food chain - A review. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 313. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.120116>
- Schrader, M., Costello, J., Godinho, L. F., & Islinger, M. (2015). Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(4), 681–702. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9819-7>
- Segall, J. J. (1992). Wine and coronary heart disease. *Lancet (London, England)*, 340(8814), 313. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1353232>
- Selli, S., Cabaroglu, T., Canbas, A., Erten, H., & Nurgel, C. (2003). Effect of skin contact on the aroma composition of the musts of Vitis vinifera L. cv. Muscat of Bornova and Narince grown in Turkey. *Food Chemistry*, 81(3), 341–347. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00428-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00428-4)
- Sequino, G., Valentino, V., Villani, F., & de Filippis, F. (2022). Omics-based monitoring of microbial dynamics across the food chain for the improvement of food safety and quality. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 157. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111242>
- Shanmuganayagam, D., Warner, T. F., Krueger, C. G., Reed, J. D., & Folts, J. D. (2007). Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 190(1), 135–142. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2006.03.017>

- Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. v., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., el Rayess, Y., Beyrouthy, M. el, Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., ... Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 694. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00694/BIBTEX>
- Sharma, S., Anjaneyulu, M., Kulkarni, S. K., & Chopra, K. (2006). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology*, 76(2), 69–75. <https://doi.org/10.1159/000089720>
- Shen, Y., Song, X., Li, L., Sun, J., Jaiswal, Y., Huang, J., Liu, C., Yang, W., Williams, L., Zhang, H., & Guan, Y. (2019). Protective effects of p-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an in vitro and in vivo evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 111, 579–587. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.12.074>
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., & Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6(4), 291–299. <https://doi.org/10.1089/109662003772519831>
- Shi, W., Zhai, C., Feng, W., Wang, J., Zhu, Y., Li, S., Wang, Q., Zhang, Q., Yan, X., Chai, L., Liu, P., Chen, Y., & Li, M. (2018). Resveratrol inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling by suppression of SphK1-mediated NF-κB activation. *Life Sciences*, 210, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.071>
- Shi, X., Dong, Z., Dalal, N. S., & Gannett, P. M. (1994). Chromate-mediated free radical generation from cysteine, penicillamine, hydrogen peroxide, and lipid hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1226(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90060-4)
- Shringarpure, R., & Davies, K. J. A. (2002). Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1084–1089. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00824-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00824-9)
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S31–S38. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2015.01.002>

- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2016.12.035>
- Sies, H. (2019). Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology Handbook of Stress Series, Volume 3*, 153–163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>
- Sies, H. (2021). Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biology*, 41. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.101867>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-045037>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-0230-3>
- Silva, P., Portillo, M. P., & Fernández-Quintela, A. (2022). Resveratrol and Wine: An Overview of Thirty Years in the Digital News. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23). <https://doi.org/10.3390/ijerph192315815>
- Silvestro, S., & Mazzon, E. (2022). Nrf2 Activation: Involvement in Central Nervous System Traumatic Injuries. A Promising Therapeutic Target of Natural Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010199>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Skaperda, Z., Argyriadou, A., Nechalioti, P. M., Alvanou, M., Makri, S., Bouroutzika, E., Kyriazis, I. D., Tekos, F., Veskoukis, A. S., Kallitsis, T., Mesnage, R., Arsenos, G., & Kouretas, D. (2021). Redox Biomarker Baseline Levels in Cattle Tissues and Their Relationships with Meat Quality. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10060958>
- Skaperda, Z., Tekos, F., Makri, S., Angelakis, C., Vassi, E., Vardakas, P., Patouna, A., Terizi, K., Kyriazi, D., & Kouretas, D. (2021). A novel combined bioactivity / chemoactivity holistic approach for the evaluation of dietary supplements. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British*

- Industrial Biological Research Association*, 152, 112159–112159.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.112159>
- Skaperda, Z., Tekos, F., Vardakas, P., Nepka, C., & Kouretas, D. (2021). Reconceptualization of Hormetic Responses in the Frame of Redox Toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1).
<https://doi.org/10.3390/IJMS23010049>
- Slaoui, M., Dreef, H. C., van Esch, E., Elwell, M., Mahler, J., & Rao, G. (1998). Inflammatory lesions in the lungs of Wistar rats. *Toxicologic Pathology*, 26(5), 712–714. <https://doi.org/10.1177/019262339802600520>
- Soares De Moura, R., Emiliano, A. F., Marins De Carvalho, L. C. R., Souza, M. A. V., Guedes, D. C., Tano, T., & Resende, A. C. (2005). Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46(3), 288–294.
<https://doi.org/10.1097/01.FJC.0000175239.26326.47>
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(5), 287. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2825\(1997\)11:5<287::aid-jcla6>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2825(1997)11:5<287::aid-jcla6>3.0.co;2-4)
- Soleas, G. J., Grass, L., Josephy, P. D., Goldberg, D. M., & Diamandis, E. P. (2002a). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35(2), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00275-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00275-8)
- Soleas, G. J., Grass, L., Josephy, P. D., Goldberg, D. M., & Diamandis, E. P. (2002b). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35(2), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00275-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00275-8)
- Soleas, G. J., Grass, L., Josephy, P. D., Goldberg, D. M., & Diamandis, E. P. (2002c). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35(2), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00275-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00275-8)
- Song, M. Y., Lee, D. Y., Chun, K. S., & Kim, E. H. (2021). The role of nrf2/keap1 signaling pathway in cancer metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094376>
- Sousa, J. S., D’Imprima, E., & Vonck, J. (2018). Mitochondrial respiratory chain complexes. *Subcellular Biochemistry*, 87, 167–227.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7

- Spanidis, Y., Veskoukis, A. S., Papanikolaou, C., Stagos, D., Priftis, A., Deli, C. K., Jamurtas, A. Z., & Kouretas, D. (2018). Exercise-Induced Reductive Stress Is a Protective Mechanism against Oxidative Stress in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/3053704>
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1539–1550. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00139-5)
- Stadtman, E. R., Moskovitz, J., & Levine, R. L. (2003). Oxidation of Methionine Residues of Proteins: Biological Consequences. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(5), 577–582. <https://doi.org/10.1089/152308603770310239>
- Stagos, D., Apostolou, A., Poullos, E., Kermeliotou, E., Mpatzilioti, A., Kreatsouli, K., Koulocheri, S. D., Haroutounian, S. A., & Kouretas, D. (2014). Antiangiogenic potential of grape stem extract through inhibition of vascular endothelial growth factor expression. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 65(6), 843–852. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25554988/>
- STATE OF THE WORLD VINE AND WINE SECTOR 2021. (2022).
- Statistics / OIV. (n.d.). Retrieved January 15, 2023, from <https://www.oiv.int/what-we-do/statistics>
- Stefanson, A. L., & Bakovic, M. (2014). Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: Focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients*, 6(9), 3777–3801. <https://doi.org/10.3390/nu6093777>
- Stepanic, V., Gasparovic, A., Troselj, K., Amic, D., & Zarkovic, N. (2015). Selected attributes of polyphenols in targeting oxidative stress in cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(5), 496–509. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150209123100>
- Stępkowski, T. M., & Kruszewski, M. K. (2011). Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(9), 1186–1195. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.033>
- Sthijns, M. M. J. P. E., Weseler, A. R., Bast, A., & Haenen, G. R. M. M. (2016). Time in Redox Adaptation Processes: From Evolution to Hormesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS17101649>

- Stranieri, C., Guzzo, F., Gambini, S., Cominacini, L., & Fratta Pasini, A. M. (2022). Intracellular Polyphenol Wine Metabolites Oppose Oxidative Stress and Upregulate Nrf2/ARE Pathway. *Antioxidants*, 11(10), 2055. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11102055/S1>
- Strati, I. F., Tataridis, P., Shehadeh, A., Chatzilazarou, A., Bartzis, V., Batrinou, A., & Sinanoglou, V. J. (2021). Impact of tannin addition on the antioxidant activity and sensory character of Malagousia white wine. *Current Research in Food Science*, 4, 937–945. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.11.017>
- Stratil, P., Kubáň, V., & Fojtová, J. (n.d.). Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech J. Food Sci*, 26(4), 242–253.
- Sundl, I., Murkovic, M., Bandoniene, D., & Winklhofer-Roob, B. M. (2007). Vitamin E content of foods: comparison of results obtained from food composition tables and HPLC analysis. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 26(1), 145–153. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2006.06.003>
- Sykiotis, G. P., & Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Science Signaling*, 3(112). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.3112RE3>
- Szweda, P. A., Camouse, M., Lundberg, K. C., Oberley, T. D., & Szweda, L. I. (2003). Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems. *Ageing Research Reviews*, 2(4), 383–405. [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(03\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(03)00028-X)
- Szweda, P. A., Friguet, B., & Szweda, L. I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00837-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00837-7)
- Taborsky, M., Ostadal, P., Adam, T., Moravec, O., Gloger, V., Schee, A., & Skala, T. (2017). Red or white wine consumption effect on atherosclerosis in healthy individuals (In Vino Veritas study). *Bratislavske Lekarske Listy*, 118(5), 292–298. https://doi.org/10.4149/BLL_2017_072
- Taborsky, M., Ostadal, P., & Petrek, M. (2012). A pilot randomized trial comparing long-term effects of red and white wines on biomarkers of atherosclerosis (in vino veritas: IVV trial). *Bratislava Medical Journal*, 113(3), 156–158. https://doi.org/10.4149/BLL_2012_037
- Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>

- Tankó, L. B., & Christiansen, C. (2006). Adipose tissue, insulin resistance and low-grade inflammation: Implications for atherogenesis and the cardiovascular harm of estrogen plus progestogen therapy. *Climacteric*, 9(3), 169–180. <https://doi.org/10.1080/13697130600738765>
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., & Siuta, M. (2020). The Impact of Oxygen at Various Stages of Vinification on the Chemical Composition and the Antioxidant and Sensory Properties of White and Red Wines. *International Journal of Food Science*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7902974>
- Tavsan, Z., & Kayali, H. A. (2019). Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109004>
- Tekos, F., Makri, S., Skaperda, Z. V., Patouna, A., Terizi, K., Kyriazis, I. D., Kotseridis, Y., Mikropoulou, E. V., Papaefstathiou, G., Halabalaki, M., & Demetrios, K. (2021). Assessment of Antioxidant and Antimutagenic Properties of Red and White Wine Extracts In Vitro. *Metabolites*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/METABO11070436>
- Tekos, F., Skaperda, Z., Vardakas, P., Kyriazi, D., Maravelis, G. C., Poulas, K., Taitzoglou, I. A., Nepka, C., & Kouretas, D. (2023). Redox Biomarkers Assessment after Oral Administration of Wine Extract and Grape Stem Extract in Rats and Mice. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 1574, 28(4), 1574. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28041574>
- Tello, J., Mammerler, R., Čajić, M., & Forneck, A. (2019). Major Outbreaks in the Nineteenth Century Shaped Grape Phylloxera Contemporary Genetic Structure in Europe. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54122-0>
- Terra, X., Montagut, G., Bustos, M., Llopiz, N., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Arola, L., & Blay, M. (2009). Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(3), 210–218. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2008.02.005>
- Terra, X., Pallarés, V., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Arola, L., & Blay, M. (2011). Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(4), 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.03.006>

- Test Guideline No. 471 Bacterial Reverse Mutation Test Section 4 Health effects OECD/OCDE 471 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Bacterial Reverse Mutation Test.* (2020). <http://www.oecd.org/termsandconditions/>.
- The organic logo.* (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from https://agriculture.ec.europa.eu/farming/organic-farming/organic-logo_en
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(17), 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7342>
- Tourtoglou, C., Nenadis, N., & Paraskevopoulou, A. (2014). Phenolic composition and radical scavenging activity of commercial Greek white wines from *Vitis vinifera* L. cv. Malagousia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(2), 166–174. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2013.12.009>
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2007.03.024>
- Tretter, V., Hochreiter, B., Zach, M. L., Krenn, K., & Klein, K. U. (2021). Understanding Cellular Redox Homeostasis: A Challenge for Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS23010106>
- Tu, W., Wang, H., Li, S., Liu, Q., & Sha, H. (2019). The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging and Disease*, 10(3), 637–651. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0513>
- Turrens, J. F., Lariccia, J., & Nair, M. G. (2009). Resveratrol Has No Effect on Lipoprotein Profile and Does Not Prevent Peroxidation of Serum Lipids in Normal Rats. <https://doi.org/10.3109/10715769709097859>, 27(6), 557–562. <https://doi.org/10.3109/10715769709097859>
- Tzanova, M., Atanassova, S., Atanasov, V., & Grozeva, N. (2020). Content of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Potential of Some Bulgarian Red Grape Varieties and Red Wines, Determined by HPLC, UV, and NIR Spectroscopy. *Agriculture 2020, Vol. 10, Page 193*, 10(6), 193. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE10060193>
- Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M., & Yodoi, J. (2002). Redox control of cell death. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(3), 405–414. <https://doi.org/10.1089/15230860260196209>

- Ursini, F., Maiorino, M., & Forman, H. J. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biology*, 8, 205–215.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.010>
- Urano, A., Yagishita, Y., & Yamamoto, M. (2015). The Keap1-Nrf2 system and diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 566, 76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.012>
- v. González de Peredo, A., Vázquez-Espinosa, M., Piñeiro, Z., Espada-Bellido, E., Ferreira-González, M., F. Barbero, G., & Palma, M. (2021). Development of a rapid and accurate UHPLC-PDA-FL method for the quantification of phenolic compounds in grapes. *Food Chemistry*, 334.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127569>
- Valamoti, S. M., Mangafa, M., Koukouli-Chrysanthaki, C., & Malamidou, D. (2007). Grape-pressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean? *Antiquity*, 81(311), 54–61. <https://doi.org/10.1017/S0003598X00094837>
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K., & Musilek, K. (2016). Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology*, 90(1), 1–37. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208.
<https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vallianou, N. G., Evangelopoulos, A., & Kazazis, C. (2013). Resveratrol and Diabetes. *The Review of Diabetic Studies : RDS*, 10(4), 236.
<https://doi.org/10.1900/RDS.2013.10.236>
- Vardakas, P., Kyriazis, I. D., Kourti, M., Skaperda, Z., Tekos, F., & Kouretas, D. (2022). Oxidative stress-mediated nanotoxicity: mechanisms, adverse effects, and oxidative potential of engineered nanomaterials. *Advanced Nanomaterials and Their Applications in Renewable Energy*, 179–218.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99877-2.00012-6>

- Vardakas, P., Skaperda, Z., Tekos, F., Trompeta, A. F., Tsatsakis, A., Charitidis, C. A., & Kouretas, D. (2021). An integrated approach for assessing the in vitro and in vivo redox-related effects of nanomaterials. *Environmental Research*, 197. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.111083>
- Vassi, E., Veskoukis, A. S., Tekos, F., Skaperda, Z., Poulas, K., Haroutounian, S., & Kouretas, D. (2022). Biological effects of grape stem extracts on human cancer cell lines. *International Journal of Functional Nutrition*, 3(3), 1–8. <https://doi.org/10.3892/IJFN.2022.27>
- Veskoukis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., & Kouretas, D. (2019). A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 99–109. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2018.10.001>
- Veskoukis, A. S., Kyparos, A., Paschalis, V., & Nikolaidis, M. G. (2016). Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 21(3), 208–217. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1126648>
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A., & Kouretas, D. (2020). Approaching reactive species in the frame of their clinical significance: A toxicological appraisal. *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111206. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111206>
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2012). Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress & Chaperones*, 17(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/S12192-011-0293-3>
- Veskoukis, A. S., Vardakas, P., & Kouretas, D. (2021). The Significance of Redox Biomarkers in the Evaluation of the Antioxidant Profile In Vitro and In Vivo. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10050805>
- Veskoukis, A. S., Vassi, E., Poulas, K., Kokkinakis, M., Asproдини, E., Haroutounian, S., & Kouretas, D. (2020). Grape Stem Extracts From Three Native Greek Vine Varieties Exhibit Strong Antioxidant and Antimutagenic Properties. *Anticancer Research*, 40(4), 2025–2032. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.14159>
- Victor, V. M., Rocha, M., & de La Fuente, M. (2004). Immune cells: Free radicals and antioxidants in sepsis. *International Immunopharmacology*, 4(3), 327–347. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.01.020>
- Victoria Moreno-Arribas, M., & Polo, C. (n.d.). *Wine Chemistry and Biochemistry*.

- Vidavalur, R., Otani, H., Singal, P. K., & Maulik, N. (2006). Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Experimental & Clinical Cardiology*, 11(3), 217. /pmc/articles/PMC2276147/
- Viña, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardó, F. v., Cuesta, A., Ferrero, J. A., Terada, L. S., & Repine, J. E. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life*, 49(6), 539–544. <https://doi.org/10.1080/15216540050167098>
- Vinña, J., Gomez-Cabrera, M.-C., Lloret, A., Marquez, R., Miñana, J., Pallardó, F., & Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 50(4–5), 271–277. <https://doi.org/10.1080/713803729>
- Virgili, M., & Contestabile, A. (2000). Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neuroscience Letters*, 281(2–3), 123–126. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00820-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00820-X)
- Vislocky, L. M., & Fernandez, M. L. (2010). Biomedical effects of grape products. *Nutrition Reviews*, 68(11), 656–670. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2010.00335.X>
- Vukovic, J., Modun, D., Budimir, D., Sutlovic, D., Salamunic, I., Zaja, I., & Boban, M. (2009). Acute, food-induced moderate elevation of plasma uric acid protects against hyperoxia-induced oxidative stress and increase in arterial stiffness in healthy humans. *Atherosclerosis*, 207(1), 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.012>
- Wadley, A. J., Veldhuijzen Van Zanten, J. J. C. S., & Aldred, S. (2013). The interactions of oxidative stress and inflammation with vascular dysfunction in ageing: The vascular health triad. *Age*, 35(3), 705–718. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9402-1>
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M. il, Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2040–2045. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0307301101>
- Wang, H., Zhang, H., Tang, L., Chen, H., Wu, C., Zhao, M., Yang, Y., Chen, X., & Liu, G. (2013). Resveratrol inhibits TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal

- transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis. *Toxicology*, 303, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.017>
- Wang, J., Ho, L., Zhao, Z., Seror, I., Humala, N., Dickstein, D. L., Thiyagarajan, M., Percival, S. S., Talcott, S. T., & Maria Pasinetti, G. (2006). Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(13), 2313–2320. <https://doi.org/10.1096/FJ.06-6281COM>
- Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G. E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G. Y., & Sun, A. Y. (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Research*, 958(2), 439–447. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03543-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03543-6)
- Wang, R. S., Oldham, W. M., Maron, B. A., & Loscalzo, J. (2018). Systems Biology Approaches to Redox Metabolism in Stress and Disease States. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(10), 953. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7256>
- Wang, R., & van Wely, M. (2020). Understand low-quality evidence: learn from food chains. *Fertility and Sterility*, 113(1), 93–94. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2019.11.026>
- Wang, X., & Quinn, P. J. (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 38(4), 309–336. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(99)00008-9)
- Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G., & Gaforio, J. J. (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3(10), 839–857. <https://doi.org/10.3390/NU3100839>
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 21–36. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2002.TB02903.X>
- Wiggers, H. J., Chevallier, P., Copes, F., Simch, F. H., da Silva Veloso, F., Genevro, G. M., & Mantovani, D. (2022). Quercetin-Crosslinked Chitosan Films for Controlled Release of Antimicrobial Drugs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 814162. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.814162>
- Wilson, T., Knight, T. J., Beitz, D. C., Lewis, D. S., & Engen, R. L. (1996). Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sciences*, 59(1). [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00260-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00260-3)
- Wine | Definition, History, Varieties, & Facts | Britannica*. (n.d.). Retrieved January 12, 2023, from <https://www.britannica.com/topic/wine>

Wine Jar - 69-12-15 | Collections - Penn Museum. (n.d.). Retrieved January 12, 2023, from <https://www.penn.museum/collections/object/72388>

Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google. (n.d.-a). Retrieved January 12, 2023, from [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=IU4HO2FeWoEC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Jackson,+R.+S.+\(2008\).+Wine+science:+principles+and+applications.+Academic+press.&ots=CO6nM4_-qW&sig=Zn7lq9dWCNtZc1DeY1HyFH2jWE&redir_esc=y#v=onepage&q=Jackson%2C%20R.%20S.%20\(2008\).%20Wine%20science%3A%20principles%20and%20applications.%20Academic%20press.&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=IU4HO2FeWoEC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Jackson,+R.+S.+(2008).+Wine+science:+principles+and+applications.+Academic+press.&ots=CO6nM4_-qW&sig=Zn7lq9dWCNtZc1DeY1HyFH2jWE&redir_esc=y#v=onepage&q=Jackson%2C%20R.%20S.%20(2008).%20Wine%20science%3A%20principles%20and%20applications.%20Academic%20press.&f=false)

Wine Science: Principles and Applications - Ronald S. Jackson - Βιβλία Google. (n.d.-b). Retrieved January 13, 2023, from [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=IU4HO2FeWoEC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Jackson,+R.+S.+\(2008\).+Wine+science:+principles+and+applications.+Academic+press.&ots=CO6nMbW_y-&sig=CGWi9lyKbfrBAPkIBYP4Ayox7B0&redir_esc=y#v=onepage&q=Jackson%2C%20R.%20S.%20\(2008\).%20Wine%20science%3A%20principles%20and%20applications.%20Academic%20press.&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=IU4HO2FeWoEC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Jackson,+R.+S.+(2008).+Wine+science:+principles+and+applications.+Academic+press.&ots=CO6nMbW_y-&sig=CGWi9lyKbfrBAPkIBYP4Ayox7B0&redir_esc=y#v=onepage&q=Jackson%2C%20R.%20S.%20(2008).%20Wine%20science%3A%20principles%20and%20applications.%20Academic%20press.&f=false)

Winterbourn, C. C., Hampton, M. B., Livesey, J. H., & Kettle, A. J. (2006). Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39860–39869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605898200>

World Wine Production Outlook OIV First Estimates. (n.d.).

Wren, A. F., Cleary, M., Frantz, C., Melton, S., & Norris, L. (2002). 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2180–2192. <https://doi.org/10.1021/JF011066W>

Wronka, M., Krzemińska, J., Młynarska, E., Rysz, J., & Franczyk, B. (2022). The Influence of Lifestyle and Treatment on Oxidative Stress and Inflammation in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415743>

Wu, J. M., & Hsieh, T. (2011). Resveratrol: a cardioprotective substance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 16–21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05854.x>

Wu, J. M., Wang, Z. R., Hsieh, T. C., Bruder, J. L., Zou, J. G., & Huang, Y. Z. (2001). Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in

- red wine (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 8(1), 3–17.
<https://doi.org/10.3892/IJMM.8.1.3>
- Wu, K. C., Liu, J., & Klaassen, C. D. (2012). Role of Nrf2 in preventing ethanol-induced oxidative stress and lipid accumulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262(3), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.05.010>
- Wu, M., Liu, F., & Guo, Q. (2019). Quercetin attenuates hypoxia-ischemia induced brain injury in neonatal rats by inhibiting TLR4/NF-κB signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 74.
<https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2019.105704>
- Wu, S., Lu, H., & Bai, Y. (2019). Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Medicine*, 8(5), 2252–2267. <https://doi.org/10.1002/CAM4.2101>
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. bin. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622. <https://doi.org/10.3390/IJMS11020622>
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C., & O'Malley, B. W. (2000). The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6379. <https://doi.org/10.1073/PNAS.120166297>
- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., & Kikuchi, M. (2002). Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 40(5), 599–607. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00006-6)
- Yang, S., & Lian, G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S11010-019-03667-9>
- Yen, G. C., & Duh, P. der. (1993). Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(4), 383–386. <https://doi.org/10.1007/BF02552711/METRICS>
- Yen, G. C., & Pin-Der, D. (1994). Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 629–632.
https://doi.org/10.1021/JF00039A005/ASSET/JF00039A005.FP.PNG_V03
- Yessenkyzy, A., Saliev, T., Zhanaliyeva, M., Masoud, A. R., Umbayev, B., Sergazy, S., Krivykh, E., Gulyayev, A., & Nurgozhin, T. (2020). Polyphenols as Caloric-

- Restriction Mimetics and Autophagy Inducers in Aging Research. *Nutrients*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/NU12051344>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/CR200084Z>
- Youness, R. A., Kamel, R., Elkasabgy, N. A., Shao, P., & Farag, M. A. (2021). Recent advances in tannic acid (gallotannin) anticancer activities and drug delivery systems for efficacy improvement; a comprehensive review. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules26051486>
- Yu, Q. M., Lim, E. J., Choi, S. K., & Seo, J. S. (2014). Antioxidant effect of grapevine leaf extract on the oxidative stress induced by a high-fat diet in rats. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 849–857. <https://doi.org/10.1007/S10068-014-0114-4/METRICS>
- Zhang, C., Liu, K., Yao, K., Reddy, K., Zhang, Y., Fu, Y., Yang, G., Zykova, T. A., Shin, S. H., Li, H., Ryu, J., Jiang, Y. N., Yin, X., Ma, W., Bode, A. M., Dong, Z., & Dong, Z. (2015). HOI-02 induces apoptosis and G2-M arrest in esophageal cancer mediated by ROS. *Cell Death & Disease* 2015 6:10, 6(10), e1912–e1912. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.227>
- Zhang, F., Liu, J., & Shi, J. S. (2010). Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: Role of resveratrol in microglial activation. *European Journal of Pharmacology*, 636(1–3), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2010.03.043>
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2016.02.002>
- Zhang, J., Hosoya, T., Maruyama, A., Nishikawa, K., Maher, J. M., Ohta, T., Motohashi, H., Fukamizu, A., Shibahara, S., Itoh, K., & Yamamoto, M. (2007). Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes. *The Biochemical Journal*, 404(Pt 3), 459. <https://doi.org/10.1042/BJ20061611>
- Zhang, R., Xu, M., Wang, Y., Xie, F., Zhang, G., & Qin, X. (2017). Nrf2—a Promising Therapeutic Target for Defensing Against Oxidative Stress in Stroke. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6006–6017. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0111-0>
- Zhang, X., Kontoudakis, N., Šuklje, K., Antalick, G., Blackman, J. W., Rutledge, D. N., Schmidtke, L. M., & Clark, A. C. (2020). Changes in Red Wine Composition during Bottle Aging: Impacts of Grape Variety, Vineyard Location, Maturity, and

- Oxygen Availability during Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13331–13343. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B07164>
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., & Agarwal, R. (1999). Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*, 20(9), 1737–1745. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.9.1737>
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. bin. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4188>
- Zhu, H., Jia, Z., Zhang, L., Yamamoto, M., Misra, H. P., Trush, M. A., & Li, Y. (2008). Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: Regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Experimental Biology and Medicine*, 233(4), 463–474. <https://doi.org/10.3181/0711-RM-304>
- Zhu, H., Santo, A., Trush, M., & Li, Y. R. (2016). Oxygen and Oxygen Toxicity: The Birth of Concepts. *Reactive Oxygen Species*, 1(1). <https://doi.org/10.20455/ROS.2016.801>
- Ziyatdinova, G., Kozlova, E., & Budnikov, H. (2016). Chronocoulometry of wine on multi-walled carbon nanotube modified electrode: Antioxidant capacity assay. *Food Chemistry*, 196, 405–410. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.075>
- Αγιωργίτικο - *Wines of Greece*. (n.d.). Retrieved January 13, 2023, from <https://winesofgreece.org/el/varieties/%CE%B1%CE%B3%CE%B9%CF%89%CF%81%CE%B3%CE%AF%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%BF/>
- Ασύρτικο - *Wines of Greece*. (n.d.). Retrieved January 13, 2023, from <https://winesofgreece.org/el/varieties/%ce%b1%cf%83%cf%8d%cf%81%cf%84%ce%b9%ce%ba%ce%bf/>
- Γκασδρόγκα, Μ., Πρόγραμμα, Β., Σπουδών, Μ., Τοξικολογία, ", & Λάρισα, Μ. Γ. (2022). Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ελληνικών κρασιών και ζύθου με συνδυασμό *in vitro* τεχνικών. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.15508>
- Γκουτζουρέλας, Ν. (2016). Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλιού σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα με συνδυασμό μοριακών τεχνικών. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.385>
- Καρανίκας, Α. (2022). Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης σταφυλιού και κρασιού *in vitro* και σε πειραματόζωα. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.15305>

- Κερασιώτη, Ε. (2014). *Επίδραση της χορήγησης σκευάσματος υδατανθράκων - πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και υποξίας μετά από άσκηση σε ανθρώπους*. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.456>
- Κούκα, Π. (2020). *Αποτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας ποικιλίας ελαιολάδου του Αγίου Όρους με συνδυασμό μοριακών τεχνικών*. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.9229>
- Κυριαζή, Δ. Α. (2022). *Εκτίμηση δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε αίμα και ιστούς αρουραίων μετά από χορήγηση εκχυλίσματος κρασιού*. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.15481>
- Μαλαγουζιά - Wines of Greece. (n.d.). Retrieved January 13, 2023, from <https://winesofgreece.org/el/varieties/%ce%bc%ce%b1%ce%bb%ce%b1%ce%b3%ce%bf%cf%85%ce%b6%ce%b9%ce%ac/>
- Μαραβέλης, Γ. (2021). *Πρώιμη τοξικολογική μελέτη 14 ημερών από του στόματος χορήγησης πολυφαινόλων από εκχύλισμα κρασιού ποικιλίας ξινόμαυρο σε μοντέλο επιμύων: ιστοπαθολογική εκτίμηση*. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.11718>
- Μπεντικούγια, Ε. (2022). *Επιδράσεις κατανάλωσης σταφυλιών και κρασιού στην υγεία του ανθρώπου*. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.15431>
- Ξινόμαυρο - Wines of Greece. (n.d.). Retrieved January 13, 2023, from <https://winesofgreece.org/el/varieties/%ce%be%ce%b9%ce%bd%cf%8c%ce%bc%ce%b1%cf%85%cf%81%ce%bf/>
- Ξίφτου, Κ. (2022). *ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΡΙΣΙΜΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ*.
- Οίνοι ΠΟΠ-ΠΓΕ. (n.d.). Retrieved January 13, 2023, from <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/2012-02-02-07-52-07/ellinikaproionta/627-oinoipoppge>
- ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΓΝΩΣΙΑ (ΔΙΤΟΜΟ) / ΣΟΥΦΛΕΡΟΣ ΗΡ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ. (n.d.). Retrieved January 12, 2023, from <https://www.politeianet.gr/books/soufleros-ir-euaggelos-thessaloniki-oinologia-epistimi-kai-technognosia-ditomo-85002>
- Παπαγαλάνης, Ν., & Παπαγаланίς, Ν. (2015). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα ΙΙΙ. Η τοξικότητα των ελεύθερων ριζών - Oxidative stress and the endogenous antioxidant system. ΙΙΙ. Reactive species toxicity. *Ελληνική Νεφρολογία - Hellenic Nephrology*, 27(1). https://www.ene.gr/eneojs_new/index.php/en/article/view/277/282

- Παχή, Δ., Θεσσαλίας, Π., & Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας, Τ. (2021). *Η επίδραση των πολυφαινολών του κρασιού στην υγεία*.
<https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.13322>
- ΠΓΕ / Προστασία Γεωγραφικής Ένδειξης - Your Europe. (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from https://europa.eu/youreurope/business/running-business/intellectual-property/geographical-indications/index_el.htm
- Πρίφτης, Α. (2019). *Αποτίμηση της βιοδραστικότητας σε εκχυλίσματα καφέ*.
<https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.378>
- Σαϊτή, Μ. (2022). «Ανάλυση του αντιοξειδωτικού προφίλ ελληνικών οίνων και ζύθου με συνδυασμό μοριακών τεχνικών (*Reducing Power, Superoxide Radical, Folin-Ciocalteu*)».
- Σκαπέρδα, Ζ.-Β. (2022). *Μελέτη δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στο κρέας παραγωγικών ζώων*. <https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.15289>
- Τσακυρίδου, Α. (2022). *Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων μπύρας και οίνου του εμπορίου μέσω των invitro μεθόδων DPPH και ABTS*.
<https://doi.org/10.26253/HEAL.UTH.15058>
- Τσετούρας, Λ. Π. (2008). *ΟΙΝΟΤΕΧΝΙΑ Η ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ*.
<https://www.politeianet.gr/books/9789603514787-tsetouras-l-panagiotis-stamoulis-oinotechnia-160412>

10 Παράρτημα

10.1 Βεβαίωση προμήθειας πειραματόζων



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

Χριστίνα Γάκη
Γραμματεία

Μ. Ασίας
Αθήνα

Τηλ:

Αθήνα,

ΠΡΟΣ Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ

ΘΕΜΑ **ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΡΟΜΗΘΕΙΑΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ**

Κατόπιν αιτήματος του εργαστηρίου Κλινικής Φαρμακολογίας, του τμήματος Ιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ, βεβαιώνουμε την ΔΩΡΕΑΝ προμήθεια αρσενικών επίμυων, τύπου

Η προμήθεια των πειραματόζων θα γίνει με σκοπό την πραγματοποίηση ερευνητικών
πρωτοκόλλων ως εξής:

Δεκαπέντε επίμυες ηλικίας εβδομάδων για το πρωτόκολλο με τίτλο «Μελέτη της
επίδρασης της τοσιλιζουμάμπης και άλλων αντιρρευματικών παραγόντων στη
συμπεριφορά, τη μνήμη, τη δευτερογενή οστεοπόρωση και την εκφύλιση τενόντιων
δομών σε νεαρούς επίμυες με πειραματική αρθρίτιδα» για την ολοκλήρωση του
πρωτοκόλλου με υπεύθυνη υλοποίησης του πρωτοκόλλου την κα Πουρζιτάκη
Χρυσούλα.

Δώδεκα επίμυες ηλικίας μηνών για το πρωτόκολλο με τίτλο «Μελέτη της
βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων γηγενών ποικιλιών οίνου και αμπέλου και
με συνδυασμό μοριακών τεχνικών» με υπεύθυνη υλοποίησης του πρωτοκόλλου τον
κο Φώτιο Τέκο

Δώδεκα επίμυες ηλικίας μηνών για το πρωτόκολλο με τίτλο «Φαρμακοκινητική
αξιολόγηση της ενίσχυσης της απορρόφησης της δυσδιάλυτης Αμφοτερικίνης Β από
αυτογαλακτωματοποιούμενες λιπιδικές φαρμακομορφές» με υπεύθυνη υλοποίησης του
πρωτοκόλλου την κα Ελένη Κοντογιαννίδου.

Με εκτίμηση

Κ Πάντος

Καθηγητής και Διευθυντής Εργ. Φαρμακολογίας

Ιατρική Σχολή Αθηνών, ΕΚΠΑ

10.2 Γνωμάτευση Επιτροπής Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων

ΓΝΩΜΑΤΕΥΣΗ ΕΑΠ

Ονομασία Ιδρύματος: Εργαστήριο Κλινικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, ΑΠΘ

Επιτροπή Αξιολόγησης: Χ. Σαρδέλη, Γ. Δελής, Μπ. Χάιδατς

Ημερομηνία, 27.1.2021

Αρ. Πρωτ.: 10

Προς την

Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας

Τμήμα: Υγείας Ζώων και Κτηνιατρικής Αντίληψης, Φαρμάκων και Εφαρμογών

Θέμα: Εισήγηση ΕΑΠΠ

Έχοντας υπόψη

Α. Τα άρθρα 37, 38 καθώς και το Παράρτημα VI του άρθρου 58 του ΠΔ 56/2013

Β. Την υπ' αριθμ. **668476(3484) 21643(87)** απόφαση της κτηνιατρικής περιφερειακής αρχής για την έγκριση σύστασης ΕΑΠΠ

Γ. Την από 7-10-2020 αίτηση του κ. Φώτη Τέκου για αδειοδότηση πειραματικού πρωτοκόλλου με τίτλο **“Μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων γηγενών ποικιλιών οίνου και αμπέλου in Vitro και in Vivo με συνδυασμό μοριακών τεχνικών.”**

Η επαρκής εισηγείται προς την αρμόδια κτηνιατρική περιφερειακή αρχή την έγκριση του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου δεδομένου ότι **πληρούνται όλες οι προϋποθέσεις του ΠΔ 56/2013.**

Ο υπεύθυνος του πρωτοκόλλου **δεν υποχρεούται** στην αναδρομική αξιολόγηση του πρωτοκόλλου.

Ο υπεύθυνος του πρωτοκόλλου **δεν υποχρεούται** στην υποβολή μη τεχνικής περίληψης.

Για την Επιτροπή Αξιολόγησης

Chrysanthi Sardeli Chrysanthi Sardeli
29.01.2021 10:30

Η Πρόεδρος

Χρυσάνθη Σαρδέλη

Αν. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας-Κλινικής Φαρμακολογίας

10.3 Άδεια ερευνητικού πρωτοκόλλου



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΗ Δ/ΝΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ
& ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΚΜ
ΤΜΗΜΑ: ΥΓΕΙΑΣ ΖΩΩΝ & ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΑΝΤΙΑΛΗΨΗΣ, ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ
ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ (ΥΖ- ΚΑΦΕ)

Θεσσαλονίκη 4 Φεβρουαρίου 2021
Αριθ. πρωτ.: 47667(198)

ΠΡΟΣ: Ως Πίνακας Διανομής

Ταχ. Δ/ση: 26ης Οκτωβρίου 64
Τ.Κ.: 54627
Πληροφορίες: Ε. Παπαγιάννη
Τηλέφωνο 2313 330387
e-mail: Ef.Papagianni@pkm.gov.gr

ΘΕΜΑ: Χορήγηση άδειας ερευνητικού πρωτοκόλλου

Α Π Ο Φ Α Σ Η

Έχοντας υπόψη:

1. Το Ν. 3852/2010 «*Νέα Αρχιτεκτονική της Αυτοδιοίκησης και της Αποκεντρωμένης Διοίκησης-Πρόγραμμα Καλλικράτης*» (ΦΕΚ 87/τ.Α/07.06.2010).
2. Τις διατάξεις του Π.Δ. 133/10 «*Οργανισμός Περιφέρειας Κεντρικής Μακεδονίας*», που δημοσιεύθηκε στο ΦΕΚ 226/τ.Α/27.12.2010.
3. Τις υπ' αριθ. 81320 + 77909/01.12.2016 Αποφάσεις του Γενικού Γραμματέα Αποκεντρωμένης Διοίκησης Μακεδονίας- Θράκης (ΦΕΚ Β' 4302/30.12.2016) «*Έγκριση τροποποίησης του Οργανισμού Εσωτερικής Υπηρεσίας της Περιφέρειας Κεντρικής Μακεδονίας*»
4. Τις διατάξεις του Ν. 1197/81 «*περί προστασίας των ζώων*» & συγκεκριμένα το αρθ.4.
5. Τις διατάξεις του Ν. 2015/92 «*περί κυρώσεως της Ευρωπαϊκής Σύμβασης για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς*».
6. Τις διατάξεις του Π.Δ. 56/13 «*Προσαρμογή της ελληνικής νομοθεσίας στην Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 (L 276/33/20.10.2010) "σχετικά με τη προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς"*» (ΦΕΚ 106/τ. Α/30.04.2013)
7. Την υπ' αριθ. πρωτ. 2215/117550-01/10/2013 ερμηνευτική εγκύκλιο του ΥΠ.Α.Α.Τ.
8. Την υπ' αριθ. πρωτ. 668476(3484), 21643(87)/14.01.2019 Απόφαση έγκρισης επιτροπής αξιολόγησης πρωτοκόλλων πειραματισμού για την εγκατάσταση *χρήσης* πειραματοζώων του Εργαστηρίου Κλινικής Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας Α.Π.Θ., με αριθμό καταχώρησης **EL-54-BIOexp-04**
9. Την από 27/01/2021 αίτηση του ενδιαφερόμενου για την αδειοδότηση πρωτοκόλλου σε επίμυες με τον τίτλο «*Μελέτη της βιολογικής δράσης εκχυλισμάτων γηγενών ποικιλιών οίνου και αμπέλου in Vitro και in Vivo με συνδυασμό μοριακών τεχνικών*» στην εγκατάσταση χρήσης πειραματοζώων με κωδικό αριθμό **EL-54-BIOexp-04**
10. Το από 20.01.2021 Πρακτικό της ΕΑΠ της εγκατάστασης χρήσης πειραματοζώων του Εργαστηρίου Κλινικής Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας Α.Π.Θ., με αριθμό καταχώρησης **EL-54-BIOexp-04**, που μας απεστάλη ηλεκτρονικά.
11. Τη με αριθ. πρωτ. 10/27.01.2021 Γνωμάτευση της ΕΑΠ της εγκατάστασης χρήσης πειραματοζώων του Εργαστηρίου Κλινικής Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας Α.Π.Θ., με αριθμό καταχώρησης **EL-54-BIOexp-04**, που συνιστά τη θετική αξιολόγηση του πρωτοκόλλου και μας απεστάλη ηλεκτρονικά.

ΑΠΟΦΑΣΙΖΟΥΜΕ

Χορηγούμε δεια πρωτοκollου για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου πειράματος σε επίμνες απ τον κ. Φώτιο Τέκο- Βιοχημικ & Βιοτεχνολόγο, ο οποίος ορίζεται και ως υπεύθυνος πρωτοκollου, καθ'σόν πληρούνται οι προϋποθέσεις της σχετικής για την προστασία των ζώων νομοθεσίας.

Υπεύθυνος χρήσης πρωτοκollου : κ. ΦΩΤΙΟΣ ΤΕΚΟΣ

Υπεύθυνος εκτέλεσης/ υλοποίησης του πρωτοκollου: κ. ΜΑΡΙΑ Π. ΤΣΑΝΤΑΡΑΙΩΤΟΥ

Υπεύθυνος για τη συμμόρφωση προς την αδειοδότηση του πρωτοκollου: κ. ΜΑΡΙΑ Π. ΤΣΑΝΤΑΡΑΙΩΤΟΥ

Εγκεκριμένη εγκατάσταση χρήσης: Εγκατάσταση **χρήσης** πειραματόζώων του Εργαστηρίου Κλινικής Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας Α.Π.Θ., με αριθμό καταχώρησης **EL-54-BIOexp-04** και υπεύθυνο κτηνίατρο τον κ. ΙΩΑΝΝΗ ΤΑΪΤΖΟΓΛΟΥ

Η παρούσα άδεια χορηγείται για χρονικό διάστημα τριών (3) ετών.Σημειώσεις

- Τροποποίηση ή ανανέωση της άδειας πρωτοκόλλου απαιτείται για τις αλλαγές του πρωτοκόλλου που δύνανται να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ευζωία των ζώων.
- Οποιαδήποτε τροποποίηση ή ανανέωση άδειας πρωτοκόλλου προϋποθέτει περαιτέρω θετική έκβαση της αξιολόγησης του πρωτοκόλλου.
- Σε περίπτωση που το πρωτόκολλο δεν εκτελείται σύμφωνα με τους όρους αδειοδότησής του, η αρμόδια περιφερειακή αρχή, σε συνεργασία με την Επιτροπή Αξιολόγησης των πρωτοκόλλων μπορεί να ανακαλέσει τη σχετική άδεια.
- Η ανάκληση της άδειας του πρωτοκόλλου δεν πρέπει να επηρεάζει αρνητικά την ευζωία των ζώων που χρησιμοποιούνται ή προορίζονται να χρησιμοποιηθούν στο πρωτόκολλο.
- Η αρμόδια κεντρική αρχή, μετά από εισήγηση της αρμόδιας περιφερειακής αρχής, ορίζει και δημοσιοποιεί τους όρους για την τροποποίηση και ανανέωση των αδειών πρωτοκόλλου.
- Οι χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές ή και λοιπές ουσίες για τη διεξαγωγή του πειράματος υπόκεινται, όσον αφορά την εισαγωγή και εν γένει κυκλοφορία τους, στις σχετικές κείμενες διατάξεις.

**Ο Προϊστάμενος
της Δ/σης Κτηνιατρικής Π.Κ.Μ.
κ.α.α.**

**Δρ. Σοφία Βασιλειάδου
Κτηνίατρος**

Πίνακας Διανομής:

1. κ. Φώτιος Τέκος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βιόπολις Μεζούρλο, Λάρισα, 41500
2. Επιτροπή αξιολόγησης πρωτοκόλλων πειραματισμού για την εγκατάσταση **χρήσης** ζώων εργαστηρίου της «Μονάδας Παθολογίας Πτηνών», της Κλινικής Παραγωγικών Ζώων, του Τμήματος Κτηνιατρικής Α.Π.Θ. με αριθμό καταχώρησης EL-54-BIOexp-03
3. Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, Γενική Δ/ση Κτηνιατρικής, Δ/ση Προστασίας των Ζώων, Φαρμάκων και Κτηνιατρικών Εφαρμογών, Τμήμα Προστασίας Παραγωγικών Ζώων και Ζώων Εργαστηρίου, Βερανζέρου 46, Τ.Κ. 10438 ΑΘΗΝΑ
4. Δ/ση Κτηνικής της Μητροπολιτικής Ενότητας Θεσσαλονίκης της Γενικής Δ/σης Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνικής

10.4 Δελτίο κλινικής εξέτασης

ΔΕΛΤΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: / /

ΗΜΕΡΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ:.....

ID Ζώου:

ΣΒ (gr)	
Δόση (mg/kg)	
Κατανάλωση τροφής (gr)	
Κατανάλωση νερού (ml)	
Περιγραφή συμπτωμάτων ¹	
Συμπεριφορά	
Όψη τριχώματος	
Δέρμα	
Στόμα	
Οφθαλμοί	
Ουρογεννητικό	
Πεπτικό	
Νευρικό	
Αναπνευστικό	
Καρδιαγγειακό	
Μυοσκελετικό	
Άλλες παρατηρήσεις	

¹ : απουσία συμπτωμάτων (-)

παρουσία συμπτωμάτων (+), περιγραφή

10.5 Δελτίο Νευρολογικής εξέτασης

Δελτίο Νευρολογικής εξέτασης

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ: / /

ΗΜΕΡΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ:.....

ID Ζώου:

	Περιγραφή αντίδρασης
Συμπεριφορά ¹ (εντός και εκτός κλωβού)	
Αντίδραση στον ήχο ²	
Στάση σώματος	
Στάση κεφαλής	
Βάδιση	
Αντανακλαστικό απειλής ³	
Αντανακλαστικό επαφής ³	
Αντανακλαστικό κόρης ⁴	
Μετακίνηση στο ένα άκρο ⁵	
Μετακίνηση στα δύο πρόσθια πόδια ⁵	
Μετακίνηση στα δύο οπίσθια άκρα ⁵	
Μετακίνηση στα δύο πρόσθια άκρα ⁵	
Μετακίνηση στα δυο πλάγια άκρα ⁵	

¹ : φυσιολογική, κατάπτωση, λήθαργος, κώμα² : φυσιολογική, υπεραισθησία, μειωμένη, απουσία³ : φυσιολογικό, μειωμένο, απουσία⁴ : φυσιολογικό (μύση), καθυστερημένο, απουσία (μυδρίαση)⁵ : φυσιολογικό, μειωμένο, απουσία

10.6 Δελτίο νεκροτομής

Δελτίο νεκροτομής

ID ζώου:

ΟΡΓΑΝΟ	ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	
		Περιγραφή αλλοιώσεων
Εξωτερική εικόνα	Τρίχωμα	
	Δέρμα	
	Οφθαλμοί	
	Βλεννογόνοι	
	Εξωτερικά γεννητικά όργανα	
	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Ρινική κοιλότητα:		
Στοματική κοιλότητα:		
Θωρακική κοιλότητα		
Κοιλιακή κοιλότητα		
Κρανιακή κοιλότητα		
Τραχεία και πνεύμονες	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Καρδιά	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		

Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Ήπαρ	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Νεφροί	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Σπλήνας	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
ΟΡΓΑΝΟ	ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ	
Στομάχι	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Περιεχόμενο		
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		

Σύσταση		
Πάγκρεας	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Περιεχόμενο		
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Λεπτό και παχύ έντερο	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Περιεχόμενο		
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Όρχεις	Παρουσία αλλοιώσεων ¹	Περιγραφή αλλοιώσεων
Μέγεθος		
Χρώμα		
Υφή		
Σύσταση		
Άλλες αλλοιώσεις	Περιγραφή αλλοιώσεων	

¹ : παρουσία αλλοιώσεων (+), απουσία αλλοιώσεων (-)

10.7 Δελτίο ιστολογικής εξέτασης

Δελτίο ιστολογικής εξέτασης

ID ζώου:

	Υπαρξη αλλοιώσεων ¹	Ένταση αλλοιώσεων ²	Περιγραφή αλλοιώσεων
Πνεύμονας			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Καρδιά			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Ήπαρ			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Νεφροί			

Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Οισοφάγος			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
	Ύπαρξη αλλοιώσεων ¹	Ένταση αλλοιώσεων ²	Περιγραφή αλλοιώσεων
Στόμαχος			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Λεπτό έντερο (12δάκτυλο)			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			

Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Λεπτό έντερο (νήστιδα)			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Λεπτό έντερο (ειλεός)			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Παχύ έντερο			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
	Ύπαρξη αλλοιώσεων ¹	Ένταση αλλοιώσεων ²	Περιγραφή αλλοιώσεων
Πάγκρεας			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			

Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			
Όρχεις			
Αρχιτεκτονική			
Κυτταρική εκφύλιση/νέκρωση			
Φλεγμονώδης διήθηση			
Αιμοδυναμικές βλάβες			
Διαταραχές κυτταρικής αύξησης			

¹Υπαρξη αλλοιώσεων : (+), Απουσία αλλοιώσεων: (-)

²Ένταση αλλοιώσεων: 1 (ελάχιστη), 2 (ήπια), 3 (μέτρια), 4 (σοβαρή))

10.8 1^η παράπλευρη ερευνητική μελέτη – Βιολειτουργικό μπισκότο από παραπροϊόντα οينوποιείων

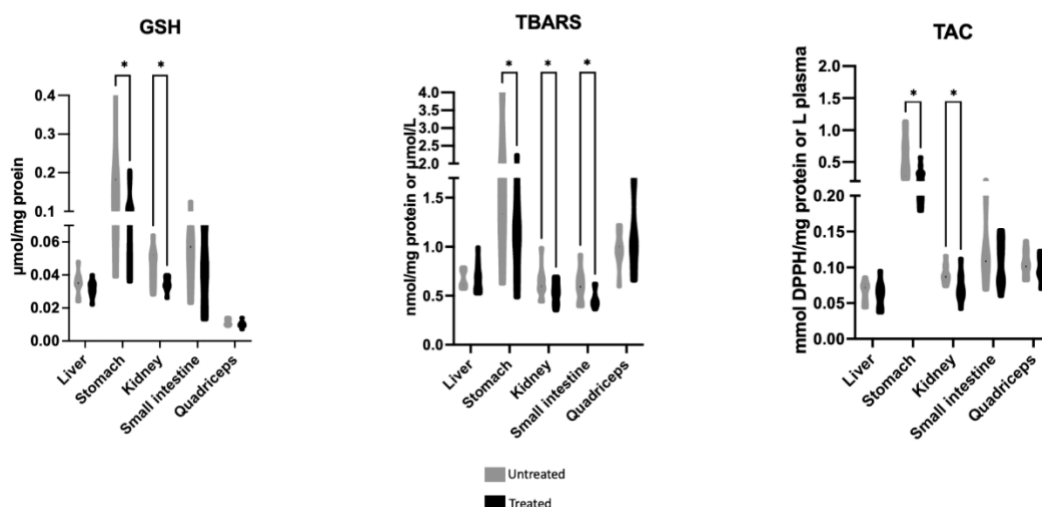
Τα παραπροϊόντα τόσο από τη διαδικασία της ερυθρής όσο και της λευκής οينوποίησης αποτελούν ένα σημαντικό περιβαλλοντικό ρύπο που προκαλεί σοβαρά προβλήματα στα υποκείμενα οικοσυστήματα, το οποίο αποκρύπτεται και χρήζει ειδικής μεταχείρισης.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και λόγω της επαφής με τα οينوποιεία προέκυψε η ανάγκη της ευαισθητοποίησης και του αισθήματος ευθύνης ως προς τη διαχείριση του αποβλήτου αυτού να εξετάσουμε την πιθανότητα το παραπροϊόν αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκχύλισμα για τη δημιουργία βιολειτουργικού τροφίμου. Σε παλαιότερες μελέτες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είχαν καταγραφεί τα ευεργετικά χαρακτηριστικά των παραπροϊόντων (Goutzourelas et al., 2014; Goutzourelas, Stagos, Housmekeridou, et al., 2015; Goutzourelas, Stagos, Spanidis, et al., 2015; A. S. Veskoukis, Vassi, et al., 2020) καθώς και της δράσης τους ως πρόσθετο ζωοτροφής στα ζώα (Kafantaris et al., 2017; Kafantaris, Kotsampasi, et al., 2018; Kafantaris, Stagos, et al., 2018). Ωστόσο με την πιθανότητα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο για την δημιουργία βιολειτουργικού τρόφιμου, τα οينوποιεία θα έχουν ένα ακόμη κίνητρο ώστε να αξιοποιήσουν αυτό το παραπροϊόν, να το επεξεργαστούν και να το πουλήσουν, βγάζοντας σημαντικό κέρδος.

Στα πλαίσια αυτά και υπό την αιγίδα του προγράμματος Ερευνώ-Δημιουργώ-Καινοτομώ με το ακρωνύμιο Funcfood, δημιουργήθηκε ένα βιολειτουργικό μπισκότο που περιείχε εκχύλισμα από βόστυχους Μαυροδάφνης και χορηγήθηκε σε πειραματόζωα (C57BL/6 mice) για 28 ημέρες σε δόση 32 mg πολυφαινόλων ανά κιλό σωματικού βάρους ανά ημέρα, μία δόση που έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν σε άλλες μελέτες (Priftis et al., 2019). Η ηλικία των ποντικών ήταν 4 μήνες και το βάρος τους ήταν περίπου 25-32 g. Η στέγαση και το όλο το πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις φροντίδας ζώων του Πανεπιστημίου Πατρών σε τυποποιημένες εργαστηριακές συνθήκες (12:12 ώρες φωτός και σκότους, ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό). Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας της Έρευνας, με βάση τον Κώδικα Δεοντολογίας και Δεοντολογίας της Έρευνας του

Πανεπιστημίου. Τα ποντίκια χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες (10-12 ποντίκια ανά ομάδα): ομάδα ελέγχου και ομάδα που της χορηγήθηκε το σκεύασμα μέσω της διαδικασίας gavage. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την τελευταία χορήγηση, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο, θυσιάστηκαν και στη συνέχεια απομονώθηκαν το ήπαρ, το στομάχι, οι νεφροί, το λεπτό έντερο και ένας τετρακέφαλος μυς.

Από τις αναλύσεις προέκυψε ότι τα επίπεδα GSH και TAC ήταν στατιστικά χαμηλότερα στους νεφρούς και το στομάχι στην ομάδα που έλαβε το βιολειτουργικό προϊόν, ενώ παρέμειναν ανεπηρέαστα τα επίπεδα στον τετρακέφαλο, το λεπτό έντερο και το ήπαρ ($p > 0,05$). Τα επίπεδα υπεροξειδωσής των λιπιδίων ήταν στατιστικά μειωμένα στα νεφρά, στο λεπτό έντερο και στο στομάχι στα ζώα που έλαβαν το τρόφιμο. Τα επίπεδα αυτά παρέμειναν ανεπηρέαστα στον τετρακέφαλο μυ και στο ήπαρ ($p < 0,05$) μεταξύ της ομάδας που έλαβε το τρόφιμο και της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 102: Επιδράσεις του βιολειτουργικού τροφίμου στα επίπεδα GSH, TAC και TBARS των ιστών των μυών μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. * $p < 0,05$

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της GSH και της TAC μειώθηκαν σε 2 από τους εξεταζόμενους ιστούς (δηλ. νεφρό, στομάχι). Παρόλα αυτά, το εκχύλισμα της Μαυροδάφνης (που περιέχονταν στο μπισκότο) έδρασε προστατευτικά έναντι της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, όπως υποδεικνύεται από τα μειωμένα επίπεδα TBARS σε τρεις από τους εξεταζόμενους ιστούς (δηλ. νεφρό, λεπτό έντερο και στομάχι). Αυτά τα ευρήματα θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα από τους

βόστρυχους της Μαυροδάφνης αποτελεί έναν αντιοξειδωτικό παράγοντα που προστατεύει από την υπεροξείδωση των λιπιδίων και, ως εκ τούτου, θα μπορούσε ενδεχομένως να είναι ευεργετικό για την ανθρώπινη υγεία. Το παράδοξο που προέκυψε στην παρούσα μελέτη έγκειται στο γεγονός ότι, ενώ τα επίπεδα TAC και GSH μειώθηκαν, το πολυφαινολικό εκχύλισμα της Μαυροδάφνης έδρασε προστατευτικά κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, όπως υποδεικνύεται από τα μειωμένα επίπεδα TBARS. Οι νεφροί και το στομάχι των ποντικών που έλαβαν το βιολειτουργικό μπισκότο παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα TBARS, τα οποία έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που εξέτασαν τις επιδράσεις των στεμφύλων και βοστρύχων σε ιστούς και όργανα των κοτόπουλων κρεοπαραγωγής (Basli et al., 2012). Οι νεφροί και το στομάχι των ζώων που έλαβαν το μπισκότο παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα GSH. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια αλλαγή στη δραστηριότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στο ρυθμό βιοσύνθεσης της GSH (π.χ. γ-GCL, GS), ή σε μια αλλαγή στην ποσότητα ή δραστηριότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στο ρυθμό ανακύκλωσής της (π.χ. GR, GPx) (Aquilano et al., 2014; Makri et al., 2017; Priftis et al., 2019). Η έκθεση των ζώων στο εκχύλισμα της Μαυροδάφνης μπορεί να προκαλέσει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πληθώρα αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών και ενζύμων, ώστε να προσφέρουν προστασία έναντι συνθηκών οξειδωτικού στρες (Vassi et al., 2022; A. S. Veskoukis, Vassi, et al., 2020). Έτσι, η ρύθμιση της έκφρασης αυτών των ενζύμων μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα της ενδογενούς GSH (Kumar et al., 2014; Rahal et al., 2014), θέτοντας το περίγραμμα των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής που πρέπει να εκτιμηθούν περαιτέρω στην συγκεκριμένη μελέτη. Επιπλέον, τα επίπεδα TAC βρέθηκαν μειωμένα στους νεφρούς και το στομάχι, ενώ παρέμειναν ανεπηρέαστα στους υπόλοιπους εξεταζόμενους ιστούς. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Το κύριο πλεονέκτημα αυτού του βιοδείκτη είναι ότι προσδιορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός βιολογικού δείγματος στο σύνολό του και όχι μόνο ενός μεμονωμένου αντιοξειδωτικού (Skaperda, Argyriadou, et al., 2021). Η μείωση των επιπέδων GSH και TAC μπορεί να συνάδει με το προηγούμενο στάδιο της παρούσας μελέτης, δεδομένου ότι αυτό το εκχύλισμα οίνου από βόστρυχους Μαυροδάφνης, αύξησε τα επίπεδα ROS σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Vassi et al., 2022). Από την άλλη πλευρά, προηγούμενη βιβλιογραφία έχει δείξει ότι η κατανάλωση ζωοτροφών εμπλουτισμένων με πολυφαινολικές ενώσεις από φυτικά εκχυλίσματα (π.χ. σταφύλια) ενισχύει τη συνολική αντιοξειδωτική δράση σε ζωτικά όργανα των αγροτικών ζώων

(Kafantaris, Stagos, et al., 2018; Kerasioti et al., 2017; Makri et al., 2017). Από την αναζήτηση στη βιβλιογραφία, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά τα υποπροϊόντα της Μαυροδάφνης σε αυτά τα είδη και είναι η πρώτη που έχει δημοσιευθεί σε διεθνές έγκυρο περιοδικό με κριτές (Tekos et al., 2023). Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ σημαντικά και ανοίγουν το δρόμο για νέες μελέτες που θα δώσουν την ευκαιρία στους οινοπαραγωγούς να αξιοποιήσουν την πολύτιμη αυτή ύλη που μέχρι πρόσφατα αποτελούσε βάρος για όλη την διαδικασία παραγωγής και να δημιουργήσουν προστιθέμενη αξία στα προϊόντα τους. Τέλος τα βιολειτουργικά προϊόντα που θα δημιουργηθούν από το προϊόν αυτό, θα βοηθούν και θα προάγουν την υγεία του ανθρώπου που τα καταναλώνει.

10.9 2^η παράπλευρη ερευνητική μελέτη – Έλεγχος αντιοξειδωτικής ικανότητας σε παλαιωμένους οίνους

Μια άλλη μεγάλη ερώτηση που δημιουργήθηκε κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής ήταν η επίδραση που έχει η παλαίωση στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οίνου. Υπάρχει κάποια χρονική στιγμή που μετά το πέρας αυτής ο οίνος χάνει την αντιοξειδωτική του ικανότητα; Εάν υπάρχει, ποια είναι αυτή;

Ο οίνος είναι ίσως το πιο αρχαίο και δημοφιλές αλκοολούχο ποτό παγκοσμίως. Οι πρακτικές οινοποίησης περιλαμβάνουν προσεκτική διαχείριση του αμπελώνα σε συνδυασμό με ελεγχόμενη αλκοολική ζύμωση και πιθανή παλαίωση του οίνου σε βαρέλια. Στη συνέχεια, ο οίνος τοποθετείται σε φιάλες και αποθηκεύεται ή διανέμεται στο λιανικό εμπόριο. Ωστόσο, θεωρείται ότι ο οίνος επιτυγχάνει τις βέλτιστες ιδιότητές του μετά από ορισμένο χρόνο αποθήκευσης στη φιάλη. Το κύριο αποτέλεσμα της αποθήκευσης στη φιάλη είναι η μείωση της στυπτικότητας και της πικράδας, η βελτίωση του αρώματος και ένα πιο ανοιχτό και σταθερό χρώμα. Αυτό οφείλεται σε μια σειρά πολύπλοκων χημικών μεταβολών των συστατικών του που περιστρέφονται γύρω από την ελαχιστοποιημένη και ελεγχόμενη διέλευση οξυγόνου στη φιάλη. Για το θέμα αυτό, προστίθενται αντιοξειδωτικά, όπως το οξείδιο του θείου, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική οξείδωση και η επακόλουθη υποβάθμιση του οίνου. Υπό την ίδια έννοια, οι φιάλες πρέπει να κλείνουν με κατάλληλα πώματα και να αποθηκεύονται σε κατάλληλες, σταθερές συνθήκες, αφού σε διαφορετική περίπτωση ο οίνος μπορεί να αναπτύξει μη ελκυστικό χρώμα, αρώματα και γεύσεις (Echave et al., 2021).

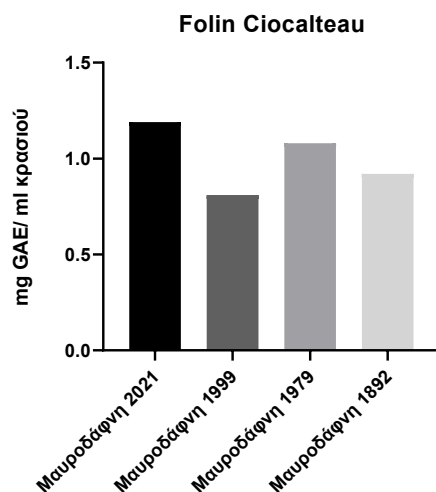
Μία μελέτη που ήλεγχε τις τεχνικές οινοποίησης και διατήρησης του οίνου σε γυάλινες φιάλες, έδειξε ότι οι διαφορετικές τεχνικές παίζουν ρόλο στη διατήρηση των αντιοξειδωτικών 12 μήνες μετά την παραμονή του οίνου στις φιάλες (Oliveira-Alves et al., 2021). Σε μία άλλη μελέτη φάνηκε ότι ο τρόπος εμφιάλωσης καθώς και η αρχική ποσότητα του οίνου σε πολυφαινόλες, επηρεάζει τη σύσταση του οίνου μετά από μία παλαίωση 5 ετών (Han et al., 2015). Εκτός από την αρχική ποσότητα των πολυφαινολών και του τρόπου εμφιάλωσης, σημαντικός παράγοντας είναι και η αποθήκευση, όπου μελέτες έχουν αναδείξει τη θετική επίδραση στα τελικά αρώματα, χρώματα και αντιοξειδωτικά, την χαμηλή και σταθερή θερμοκρασία (12°C έναντι των 30°C) και την χαμηλή έκθεση στο φως (Pati et al., 2020).

Στην παρούσα μελέτη, ο βασικός στόχος ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης των αντιοξειδωτικών από την παλαιώση σε δρύινα βαρέλια για μεγάλες χρονικές περιόδους. Για το σκοπό αυτό συγκεντρώθηκαν 4 δείγματα οίνου ποικιλίας Μαυροδάφνης εκ των οποίων τα 3 ήταν σε φιάλες (μετά από μία πάροδο τουλάχιστον 1 έτους σε βαρέλι, 2021,1999, 1979) και το 1 δείγμα και παλαιότερο (1892), λήφθηκε απευθείας από το βαρέλι. Χαρακτηριστικό στιγμιότυπο από την στιγμή της δειγματοληψίας φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

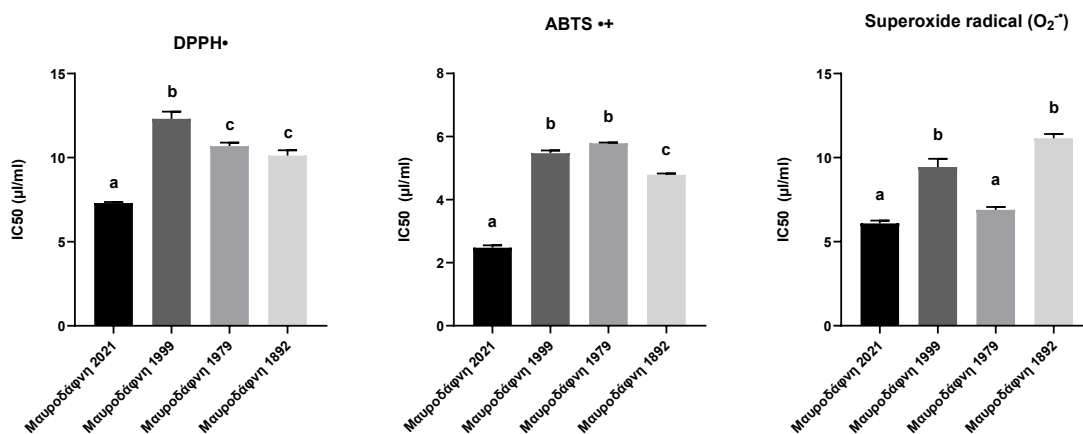


Εικόνα 103: Δειγματοληψία οίνου ποικιλίας Μαυροδάφνης διατηρημένο για 130 χρόνια σε βαρέλι.

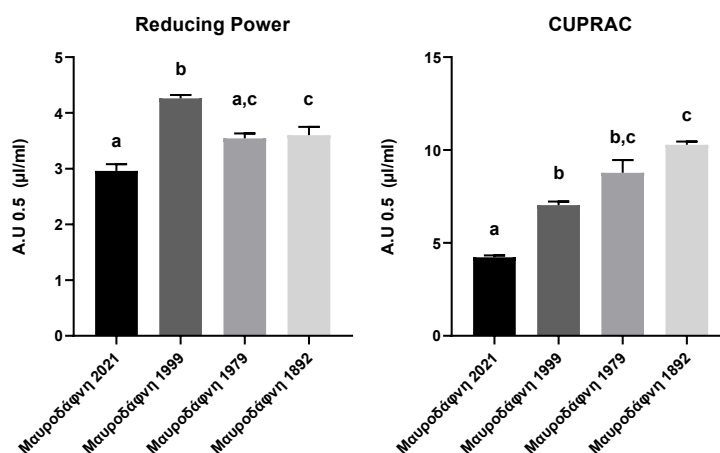
Τα 4 δείγματα ελήφθησαν και αξιολογήθηκαν με τις μεθόδους αξιολόγησης και εκτίμησης που χρησιμοποιήθηκαν και για τα δείγματα της διδακτορικής διατριβής στο 1^ο επίπεδο αναλύσεων στο κεφάλαιο 3. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 104: Ολικό Πολυφαινολικό περιεχόμενο των τεσσάρων δειγμάτων οίνου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν mg γαλλικού οξέος ανά ml δείγματος.



Εικόνα 105: Ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH•, ABTS•+, O₂^{•-} των τεσσάρων δειγμάτων οίνου. a-c: Μπάρες με διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.



Εικόνα 106: Ικανότητα αναγωγής των ιόντων σιδήρου και χαλκού των τεσσάρων δειγμάτων οίνου. a-c: Μπάρες με διαφορετικό γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Από τα αποτελέσματα προέκυψαν τα παρακάτω:

- Η Μαυροδάφνη του 2021, εμφάνισε την υψηλότερη δραστικότητα στο σύνολο των μεθόδων που μελετήθηκαν (χαμηλότερη τιμή συγκέντρωσης IC50, σημαίνει υψηλότερη δραστικότητα).
- Η Μαυροδάφνη του 1892, ήταν δεύτερη σε δραστικότητα, όσον αφορά την ικανότητά της να εξουδετερώνει τις ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}.
- Φαίνεται πως τα συστατικά της Μαυροδάφνης του 1892 παρά την μεγάλη πάροδο του χρόνου έχουν διατηρήσει το σημαντικότερο μέρος της βιοδραστικότητάς τους.

Ανάλογα με τη φύση της κάθε μεθόδου τα διάφορα αντιοξειδωτικά που περιέχει ο οίνος δρουν με διαφορετικό τρόπο, για αυτό παρατηρείται μια ποικιλομορφία στα αποτελέσματα μεταξύ των μεθόδων. Για το λόγο αυτό, για να μην αποκλειστεί δηλαδή η δράση κάποιου συστατικού σε κάποια μέθοδο, μελετήθηκε ένα σύνολο μεθόδων. Εν κατακλείδι, φάνηκε πως η πιο πρόσφατη σε χρονολογία εμφιάλωσης μαυροδάφνη (2021) ήταν η πιο δραστική στο σύνολο των μεθόδων που μελετήθηκε, με δεύτερη σε δραστικότητα τη Μαυροδάφνη του 1892. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο υψηλότερο περιεχόμενο σε πολυφαινόλες της Μαυροδάφνης του 2021, γεγονός που εξηγεί την αντιοξειδωτική της δράση.

Οι παλαιωμένοι ερυθροί οίνοι έχουν σημαντικά διαφορετική πολυφαινολική σύσταση σε σύγκριση με τα πρόσφατης εμφιάλωσης, κυρίως λόγω, όχι μόνο του σχηματισμού πολυμερών ενώσεων, αλλά και της οξείδωσης, της υδρόλυσης και άλλων μετασχηματισμών που μπορεί να συμβούν στα γηγενή φαινολικά του σταφυλιού κατά

την παλαίωση (Arnous et al., 2001; Saucier, 2010). Η ωρίμανση των ερυθρών οίνων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει εκτεταμένο μετασχηματισμό των αυτοφυών πολυφαινολών σταφυλιού και οι παλιωμένοι οίνοι περιέχουν ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο μείγμα απλών και πολυμερών πολυφαινολών, η φύση των οποίων είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστη (Arnous et al., 2001). Η βιοδραστικότητα των παλιωμένων ερυθρών οίνων είναι συνέπεια της συνέργειας μεταξύ των διαφόρων φαινολικών ουσιών, η περιεκτικότητα των οποίων διαφοροποιείται με την πάροδο των ετών (Ivanova et al., 2012; Peri et al., 2015; Saucier, 2010). Στις παρακάτω βιβλιογραφικές αναφορές υπάρχουν ενδείξεις για την διαφοροποίηση που επέρχεται στη πολυφαινολική σύσταση δειγμάτων ερυθρών οίνων έπειτα από μικρές χρονικές περιόδους παλαίωσης. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά την διαφοροποίηση που επέρχεται στη βιοδραστικότητα των οίνων μετά τις αλλαγές στην πολυφαινολική τους σύσταση, οι οποίες έχουν επέλθει μετά από μακροχρόνιες περιόδους παλαίωσης.

Σε μελέτη των Peri *et al.*, παρατηρήθηκε ότι η παλαίωση επέφερε σημαντική αύξηση στο πολυφαινολικό περιεχόμενο (*p*-κουμαρικό οξύ, γαλλικό οξύ) και στην αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων οίνου έπειτα από 5 έως 7 χρόνια παλαίωσης (Peri et al., 2015). Οι παρατηρούμενες αλλαγές στο πολυφαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων ερυθρού οίνου κατά τη διάρκεια της παλαίωσης μπορεί πιθανώς να οφείλονται στον μετασχηματισμό φαινολικών ενώσεων σε συμπυκνωμένες μορφές που έχουν ελαφρώς διαφορετικές χημικές ιδιότητες και δραστικότητα. Ταυτόχρονα, θα μπορούσαν επίσης να οφείλονται στην ενζυμική δραστηριότητα από υπολειμματικούς μικροοργανισμούς που υπάρχουν στον ερυθρό οίνο (Monagas et al., 2006).

Η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος, που φάνηκε να είναι το πρωτεύον φαινολικό οξύ στους ερυθρούς οίνους, ήταν σημαντικά αυξημένη μετά την παλαίωση κόκκινων κρασιών (Peri et al., 2015). Οι κύριες πηγές γαλλικού οξέος στον οίνο είναι οι σπόροι σταφυλιού και τα δρύινα βαρέλια (Anli & Vural, 2009). Άρα, μια πιθανή εξήγηση της αυξημένης περιεκτικότητας σε γαλλικό οξύ μετά την παλαίωση μπορεί να είναι η εξαγωγή αυτής της ένωσης από τα δρύινα βαρέλια στον οίνο κατά την περίοδο παλαίωσης.

Οι Peri *et al.*, παρατήρησαν επίσης ότι η παλαίωση των οίνων είχε ως αποτέλεσμα και τη σημαντική αύξηση της περιεκτικότητας σε φλαβονόλες (κερκετίνη, καμφερόλη) και φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη) σε όλα τα δείγματα που

μελέτησαν. Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα δεδομένα, η παλαίωση των κόκκινων κρασιών εκτός από αύξηση, μπορεί να επιφέρει και μείωση της περιεκτικότητας σε φλαβονόλες. Πιο συγκεκριμένα, σημαντική μείωση αυτών παρατηρήθηκε σε δείγμα οίνου *Shiraz* παλαίωσης 4 ετών σε σύγκριση με τα 2 έτη (Peri et al., 2015). Η μείωση σε αυτό το δείγμα ως αποτέλεσμα της παλαίωσης θα μπορούσε να οφείλεται στον συνδυασμό σακχάρων και αγλυκονών φλαβονόλης για να σχηματιστούν οι γλυκοσίδες της φλαβονόλης. Ενώ όλο και περισσότερες γλυκοσίδες φλαβονόλης σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου, υδρολύονται σε γλυκόνες φλαβονόλης στα δρύινα βαρέλια, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί η ποσότητα των φλαβονολών μειώνεται με την παλαίωση (Fang et al., 2007). Επιπλέον, οι παλαιωμένοι οίνοι ποικίλουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε φλαβαν-3-όλες. Αυτή η ποικιλομορφία στην ποσότητα των φλαβονολών μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους λόγους: αφενός, η συγκέντρωση της φλαβαν-3-όλης τείνει να μειώνεται καθώς εμπλέκονται σε αντιδράσεις οξείδωσης, καθώς και σε αντιδράσεις πολυμερισμού ταννίνης-ταννίνης και ανθοκυανίνης-ταννίνης. Από την άλλη πλευρά, μια αύξηση στη συγκέντρωση των φλαβαν-3-ολών παρατηρείται επίσης επειδή μπορούν να απελευθερωθούν από πρόδρομα μόριά τους (Gutiérrez et al., 2005).

Στην ίδια μελέτη των Peri et al., παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα αυξημένα τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας οίνων παλαίωσης έως 7 ετών σε σχέση με το πρώτο έτος παλαίωσής τους (Peri et al., 2015). Συγκεκριμένα, είδαν ότι η ικανότητα ενός δείγματος ερυθρού οίνου να εξουδετερώνει τη ρίζα ABTS, έπειτα από μικρή χρονική περίοδο παλαίωσης 3,4 και 5 ετών, ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την πρόσφατη εμφιάλωσή του, διαρκείας ενός έτους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη η Μαυροδάφνη του 2021, εμφάνισε την υψηλότερη δραστικότητα στο σύνολο των μεθόδων που μελετήθηκαν, ενώ παράλληλα, η Μαυροδάφνη του 1892, ήταν δεύτερη σε δραστικότητα, όσον αφορά την ικανότητά της να εξουδετερώνει τις ρίζες DPPH και ABTS. Φάνηκε λοιπόν ότι παρά την μακροχρόνια περίοδο παλαίωσής της, τα συστατικά της έχουν διατηρήσει το σημαντικότερο μέρος της βιοδραστητικότητάς τους.

Εν κατακλείδι, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα δείγματα οίνου από τις χρονιές 1892, 1979, 1999 και 2021 δεν έχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους σε καμία από τις μεθόδους που αξιολογήθηκαν. Το εύρημα αυτό είναι πάρα πολύ

σημαντικό, και παρουσιάζεται για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία, αναδεικνύοντας την ποιότητα των Ελληνικών ποικιλιών και συγκεκριμένα της Μαυροδάφνης καθώς και το συνδυασμό της παράδοσης με την τεχνολογία και τις νέες μεθόδους οινοποίησης, διατήρησης και κυρίως ποιοτικού ελέγχου που διαθέτουν τα οινοποιεία της χώρας μας.

10.10 Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

Γεννήθηκα το 1995 στην Θεσσαλονίκη όπου και φοίτησα αρχικά στο 22^ο Δημοτικό σχολείο Ευόσμου και στην συνέχεια στο Γυμνάσιο και Λύκειο των Εκπαιδευτηρίων Μαντουλίδη από όπου και αποφοίτησα. Η αγάπη μου για τις βιολογικές επιστήμες σίγουρα οφείλετε σε ένα βαθμό στον καθηγητή μου στο μάθημα της Βιολογίας Παναγιώτη Ντόλκερα. Οι πανελλήνιες εξετάσεις με έφεραν στο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στην Λάρισα, την 2^η επιλογή μου μετά την Βιολογία Θεσσαλονίκης (την είχα επιλέξει για να μην αλλάξω πόλη και αυξηθούν τα έξοδα προς την οικογένεια μου).

Τελείωσα το τμήμα Βιοχημείας σε 4 χρόνια (Σεπτέμβριος 2013 – Ιούλιος 2017) από όπου και έλαβα Αριστείο για την επίτευξη άριστης ακαδημαϊκής επίδοσης. Η πρακτική άσκηση που έκανα στο 2^ο έτος των σπουδών μου στο Μικροβιολογικό – Βιοχημικό – Ιολογικό εργαστήριο τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης Παπαγεωργίου μου έδωσε το πρώτο ερέθισμα και έτσι εκπόνησα την διπλωματική μου εργασία με τίτλο «In vitro κατασκευή ανασυνδυασμένων στελεχών μεταξύ του εμβολιακού στελέχους Sabin 1 και Coxsackie A13» στο Εργαστήριο μικροβιολογίας – ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με την βοήθεια του τότε υποψήφιου διδάκτορα και φίλου Τηλέμαχου Δημητρίου. Στον τελευταίο χρόνο των σπουδών μου, η επαφή με το μάθημα της Τοξικολογίας μου έδωσε νέα ερεθίσματα και η οπτική της σύγχρονης τοξικολογίας αποτέλεσε για μένα αφορμή να παρακολουθήσω το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών Τοξικολογία στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Οκτώβριος 2017 – Μάρτιος 2019). Η εμβάθυνση των γνώσεων μου γύρω από τα θέματα που πραγματεύεται και απασχολούν την τοξικολογία του σήμερα, με έστρεψε στην αναζήτηση φυσικών πηγών, φυσικών προϊόντων που θα μπορούσαν να προστατέψουν το περιβάλλον και τον άνθρωπο από όλα αυτά που βάλετε καθημερινά. Για τον λόγο αυτό εκπόνησα την μεταπτυχιακή μου μελέτη με τίτλο «Εκτίμηση αντιοξειδωτικής & αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων ανθών ελιάς και αγριελιάς» στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του ίδιου τμήματος. Κατά την διάρκεια των σπουδών μου, αγάπησα το αντικείμενο και οι ατελείωτες συζητήσεις μου με τον κ. Κουρέτα γύρω από αντίστοιχα κοινωνικά και περιβαλλοντικά αντικείμενα όπως και θέματα γύρω από την υγεία και ευεξία, με οδήγησαν στην έναρξη του διδακτορικού (Μάρτιος του 2020 – Απρίλιος 2023) που ολοκληρώνεται στην επόμενη σελίδα του παρόντος συγγράμματος.

Κατά την περίοδο 2019 – 02/2023 έγινα συν-συγγραφέας σε 30 επιστημονικά άρθρα σε διεθνή έγκυρα περιοδικά με κριτή τα οποία έχουν αναφερθεί 658 φορές ενώ ο δείκτης h-intex ήταν 11 όπως και ο i10-index επίσης 11. Επιπλέον είμαι συν-συγγραφέας ενός Βιβλίου με τίτλο «Διαλειμματική Νηστεία και αποφυγή νόσων» των εκδόσεων Αρμός.

Εκτός από τα παραπάνω, από τον Φεβρουάριο του 2019 είμαι συνιδρυτής και διευθύνων σύμβουλος της FoodOxys IKE Τεχνοβλαστός, μιας εταιρείας που προέκυψε από την γνώση και τις τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τα τελευταία 20 χρόνια. Στην ομάδα της FoodOxys και στον επιχειρηματικό σχεδιασμό της επένδυσε ήδη ένα Venture Capital, το Uni.fund. Σημαντικός σταθμός στην διαδρομή της εταιρείας είναι η κατοχύρωση πατέντας για την αξιολόγηση των συμπληρωμάτων διατροφής καθώς και η καταχώρηση στο Γραφείο Διανοητικής Ιδιοκτησίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης ενός σήματος για την αξιολόγηση της ποιότητας των αγροδιατροφικών προϊόντων (του πρώτου σήματος της χώρας που κατατίθεται εκεί και εγκρίνεται για το συγκεκριμένο αντικείμενο).

Τέλος, η μεγάλη δουλειά που έχει γίνει από την ομάδα και τα στελέχη της εταιρείας στο πεδίο της αξιοποίησης των παραπροϊόντων διάφορων διαδικασιών όπως της οινοποίησης, ελαιοποίησης κτλ, οδήγησε στην δημιουργία μίας νέας εταιρείας τον Ιούλιο του 2022 όπου και διευθύνω, της Olea Fortius IKE, με κύριο σκοπό την επιστημονική ανάπτυξη, ανάδειξη και εμπορία παραπροϊόντων όπως τα παραπάνω για εμπλουτισμό Ζωοτροφών κ.α.

λα τα παραπάνω αποτέλεσαν σημαντικούς σταθμούς της μέχρι τώρα ζωής μου και σημαντικά εφόδια για το μέλλον.

Η πραγματική γενναιοδωρία προς το μέλλον έγκειται στο να τα δίνουμε όλα στο παρόν.

Αλμπέρ Καμύ, 1913-1960, Γάλλος συγγραφέας, Νόμπελ 1957

Τοις τολμώσιν η τύχη ξύμφορος...