

**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΠΑΝ**

ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΡΓΟΥ

Τίτλος Έργου : ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (VITIS VINIFERA) - ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΩΣ ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Κωδικός έργου	: 01ΕΔ227
Ανάδοχος	: ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Επιστημονικός Υπεύθυνος	: ΚΑΘ. ΣΕΡΚΟΣ Α. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ
Μέτρο	: 8.3
Δράση	: Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού ΠΕΝΕΔ 2001
Αρμόδια Διεύθυνση ΓΓΕΤ	: Δ/ση Υποστήριξης Ερευνητικών Προγραμμάτων
Χειριστής	: Ε. Τσάμη

1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΡΓΟΥ

1.1 Τίτλος έργου

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ (VITIS VINIFERA) - ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΩΣ ΧΗΜΕΙΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

1.2 Συνοπτική περιγραφή του έργου

Αντικείμενο του έργου είναι η μελέτη της χημικής σύστασης ελληνικών οίνων και των αντίστοιχων ποικιλιών σταφυλιού, καθώς και η διερεύνηση του βιολογικού ρόλου των συστατικών τους. Οι κυριότεροι επιμέρους στόχοι συνίστανται:

α) στη ποιοτική και ποσοτική καταγραφή των βιολογικά δραστικών συστατικών που περιέχονται σε ελληνικούς οίνους, καθώς και τις αντίστοιχες γηγενείς ποικιλίες σταφυλιού,

β) στην αξιολόγηση της βιολογικής δράσης τους ως κυτταροστατικών / χημειοπροστατευτικών παραγόντων με πειράματα *in vitro* και *in vivo*, και

γ) στη μελέτη του μηχανισμού χημειοπροστατευτικής δράσης τους στο καρκίνο του παχέος εντέρου, συγκεκριμένα στη δράση ενός βασικού παράγοντα στον καρκίνο αυτό, του ογκογονιδίου K-ras

Επίσης, θα μελετηθεί η επίδραση:

α) της αμπελοκομικής τεχνικής και

β) της μεθόδου οινοποίησης

στα βιολογικά χαρακτηριστικά των οίνων.

και θα αναπτυχθεί νέα μεθοδολογία ταχείας ανίχνευσης των βιολογικά δραστικά ουσιών αυτών στο γλεύκος και το κρασί.

1.3 Επιστημονικός Υπεύθυνος του Έργου

Όνοματεπώνυμο	ΣΕΡΚΟΣ Α. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ
Ιδιότητα-Θέση	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ Γ.Π.Α.
Φορέας	ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ (ΓΠΑ)
Ταχ. Διεύθυνση	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΙΕΡΑ ΟΔΟΣ 75, ΑΘΗΝΑ 11855
Τηλ.	210 5294247
Fax	210 5294265
E-mail	sehar@aua.gr

1.4 Φορείς Υλοποίησης Κύριος Ανάδοχος Φορέας

Επωνυμία	ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Αρμόδιο Πρόσωπο για συνεννόηση	ΔΡ. ΣΟΦΙΑ ΚΟΥΛΟΧΕΡΗ
Ταχ. Διεύθυνση	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΙΕΡΑ ΟΔΟΣ 75, ΑΘΗΝΑ 11855
Τηλ.	210-5294247 ΚΑΙ 210-5294246
Fax	210-5294265
E-mail	skoul@aua.gr

Συνεργαζόμενος Φορέας

Επωνυμία	ΕΘΝ. & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝ/ΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ (ΕΚΠΑ)
Ταχ. Διεύθυνση	ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ, ΠΑΝ/ΠΟΛΙΣ ΖΩΓΡΑΦΟΥ
Τηλ.	210-7274290 ΚΑΙ 210-7274598
Fax	210-7274594
E-mail	mitakou@pharm.uoa.gr

Συνεργαζόμενος Φορέας

Επωνυμία	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (ΠΘ)
Ταχ. Διεύθυνση	ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Τηλ.	2410-759310
Fax	
E-mail	dkouret@uth.gr

Συνεργαζόμενος Φορέας

Επωνυμία	ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ, ΙΒΕΒ (ΕΙΕ)
Ταχ. Διεύθυνση	ΒΑΣ. ΚΩΝ/ΝΟΥ 48, ΑΘΗΝΑ 11635
Τηλ.	210-7273753
Fax	210-7273745
E-mail	apint@eie.gr

Συνεργαζόμενος Φορέας

Επωνυμία	ΜΟΥΣ. ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΓΟΥΛΑΝΔΡΗ ΕΡΕΥΝ. ΚΕΝΤΡΟ ΓΑΙΑ (ΜΓΦΙ)
Ταχ. Διεύθυνση	ΛΕΒΙΔΟΥ 13, ΚΗΦΙΣΙΑ
Τηλ.	210-6233255
Fax	
E-mail	atsarbop@gnhm.gr

Φορέας Συγχρηματοδότησης

Επωνυμία	ΚΕΟΣΟΕ
Ταχ. Διεύθυνση	Λ. ΡΙΑΝΚΟΥΡ 73, ΑΘΗΝΑ 11523
Τηλ.	210-6923102
Fax	210-6481182
E-mail	keosoe@otenet.gr

Ανάδοχος μη Ερευνητικός Φορέας

Επωνυμία	
Ταχ. Διεύθυνση	
Τηλ.	
Fax	
E-mail	

1.5 Υπεύθυνοι των φορέων υλοποίησης

Κύριος Ανάδοχος φορέας : ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Αρ. τραπεζικού λογ/σμού : ΕΘΝΙΚΗ ΤΡΑΠΕΖΑ 040540996-94

	Νόμιμος εκπρόσωπος	Επιστημονικός Υπεύθυνος Έργου
Όνοματεπώνυμο	ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ	ΣΕΡΚΟΣ ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ
Θέση	ΑΝΤΙΠΡΥΤΑΝΗΣ	ΚΑΘΗΤΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
Διεύθυνση	ΙΕΡΑ ΟΔΟΣ 75, ΑΘΗΝΑ 11855	ΙΕΡΑ ΟΔΟΣ 75, ΑΘΗΝΑ 11855
Τηλ.	210-5294802	210-5294247
Fax	210-5292832	210-5294265
E-mail		sehar@aua.gr

Συνεργαζόμενος φορέας : ΕΘΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

	Νόμιμος εκπρόσωπος	Υπεύθυνος ερευνητικής ομάδας
Όνοματεπώνυμο	ΚΑΘ. Μ. ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗΣ	ΣΟΦΙΑ ΜΗΤΑΚΟΥ
Θέση	ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΡΕΥΝΩΝ-ΑΝΤΙΠΡΥΤΑΝΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΝ ΥΠΟΘΕΣΕΩΝ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Διεύθυνση	ΧΡΗΣΤΟΥ ΛΑΔΑ 6, ΑΘΗΝΑ 10561	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΤΜΗΜΑ, ΠΑΝ/ΠΟΛΙΣ ΖΩΓΡΑΦΟΥ
Τηλ.	210-7275078	210-7274290 ΚΑΙ 210-7274598
Fax	210-7275010	210-7274584
E-mail	re@elke.uoa.gr	mitakou@pharm.uoa.gr

Συνεργαζόμενος φορέας : ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

	Νόμιμος εκπρόσωπος	Υπεύθυνος ερευνητικής ομάδας
Όνοματεπώνυμο	ΚΩΝ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ	ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ
Θέση	ΑΝΤΙΠΡΥΤΑΝΗΣ-ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΡΕΥΝΩΝ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΗΣ
Διεύθυνση	ΚΤΙΡΙΟ ΠΑΠΑΣΤΡΑΤΟΥ ΑΡΓΟΝΑΥΤΩΝ -ΦΙΛΕΛΛΗΝΩΝ ΒΟΛΟΣ	ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Τηλ.	24210-74501	2410-759310
Fax	24210-74501	
E-mail	Gourgoul@uth.gr	dkouret@uth.gr

Συνεργαζόμενος φορέας : ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

	Νόμιμος εκπρόσωπος	Υπεύθυνος ερευνητικής ομάδας
Όνοματεπώνυμο	ΙΩΝ ΣΙΩΤΗΣ	ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΠΙΝΤΖΑΣ
Θέση	ΠΡΟΕΔΡΟΣ Δ.Σ.	ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α
Διεύθυνση	ΕΙΕ, ΒΑΣ. ΚΩΝ/ΝΟΥ 48, ΑΘΗΝΑ 116 35	ΕΙΕ/ΙΒΕΒ, ΒΑΣ. ΚΩΝ/ΝΟΥ 48, ΑΘΗΝΑ 11635
Τηλ.	210-7273500	210-7273753
Fax	210-7246648	210-7273745
E-mail		apint@eie.gr

Συνεργαζόμενος φορέας : ΜΟΥΣΕΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ ΙΣΤΟΡΙΑΣ ΓΟΥΛΑΝΔΡΗ

	Νόμιμος εκπρόσωπος	Υπεύθυνος ερευνητικής ομάδας
Όνοματεπώνυμο	ΦΑΛΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ	ΑΝΤΩΝΗΣ ΤΣΑΡΜΠΟΠΟΥΛΟΣ
Θέση	ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΥΣ	Επ. Υπευθ. Βιοαναλυτικού Εργαστηρίου
Διεύθυνση	Κέντρο ΓΑΙΑ, Λεβίδου 13 Κηφισιά	Κέντρο ΓΑΙΑ, Λεβίδου 13 Κηφισιά
Τηλ.	210- 8015870	210-6233255
Fax	210-8080674	
E-mail		atsarbop@gnhm.gr

Φορέας Συγχρηματοδότησης : ΚΕΟΣΟΕ

	Νόμιμος εκπρόσωπος	Υπεύθυνος ερευνητικής ομάδας
Όνοματεπώνυμο	Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ	Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ
Θέση	ΔΙΕΥΘΥΝΩΝ ΣΥΜΒΟΥΛΟΣ	ΔΙΕΥΘΥΝΩΝ ΣΥΜΒΟΥΛΟΣ
Διεύθυνση	Λ. ΡΙΑΝΚΟΥΡ 73, ΑΘΗΝΑ 11523	Λ. ΡΙΑΝΚΟΥΡ 73, ΑΘΗΝΑ 11523
Τηλ.	210-6923102	210-6923102
Fax	210-6481182	210-6481182
E-mail	keosoe@otenet.gr	keosoe@otenet.gr

Ανάδοχος μη Ερευνητικός Φορέας :

	Νόμιμος εκπρόσωπος	Υπεύθυνος ερευνητικής ομάδας
Όνοματεπώνυμο		
Θέση		
Διεύθυνση		
Τηλ.		
Fax		
E-mail		

1.6 Προϋπολογισμός : ΕΥΡΩ

1.7 Διάρκεια έργου : Μήνες

2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΚΟΥ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΥ

2.1 Αντικείμενο Έρευνας– Στόχοι του Έργου

Από επιδημιολογικά και ερευνητικά δεδομένα, έχει διαπιστωθεί η ευεργετική για την υγεία παρουσία (τόσο στο σταφύλι, όσο και στο κρασί), φυσικών συστατικών που είναι ικανά να προστατεύουν από τα καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλά και να αποτοξινώνουν τον οργανισμό από τα ξеноβιοτικά. Στο σταφύλι (στο φλοιό αλλά και στα γίγαρτα) και στο κρασί περιέχονται φαινολικά κυρίως παράγωγα (δευτερογενείς μεταβολίτες), ορισμένα από τα οποία προσδίδουν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (χρώμα, άρωμα, γεύση) και άλλα διαθέτουν αξιολογούμενη βιολογική δράση (αντιοξειδωτική, κυτταροστατική, χημειοπροστατευτική κλπ.).

Έτσι, κύρια αντικείμενα της ερευνητικής αυτής πρότασης είναι:

- α) η ποιοτική και ποσοτική καταγραφή των βιολογικά δραστικών συστατικών που περιέχονται σε ελληνικούς οίνους, καθώς και στις αντίστοιχες γηγενείς ποικιλίες σταφυλιού,
- β) η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης τους ως κυτταροστατικών – χημειοπροστατευτικών παραγόντων με πειράματα *in vitro* και *in vivo* και
- γ) η μελέτη του μηχανισμού χημειοπροστατευτικής δράσης τους στο καρκίνο του παχέος εντέρου, συγκεκριμένα στη δράση ενός βασικού παράγοντα στον καρκίνο αυτό, του ογκογονιδίου K-ras

Επίσης, θα μελετηθεί η επίδραση:

- α) της αμπελοκομικής τεχνικής και
- β) της μεθόδου οινοποίησης

στα βιολογικά χαρακτηριστικά των οίνων.

Για τους σκοπούς αυτούς θα αναπτυχθεί νέα μεθοδολογία ταχείας ανίχνευσης των βιολογικά δραστικών ουσιών αυτών στο γλεύκος και το κρασί.

Αναλυτικότερα, οι επιμέρους στόχοι της ερευνητικής πρότασης μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

- Προσδιορισμός, ταυτοποίηση και λεπτομερής ποιοτική και ποσοτική καταγραφή των σημαντικότερων από βιολογική άποψη συστατικών (κατεχίνη, επικατεχίνη, *trans*-ρεσβερατρόλη, *cis*-ρεσβερατρόλη, ρουτίνη, ελλαγικό οξύ, κερκετίνη, ασκορβικό οξύ, γλουταθειόνη, πτητικά συστατικά,) που περιέχονται στα σταφύλια, το γλεύκος και οίνο των σημαντικότερων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου.

- Ποιοτική και ποσοτική καταγραφή των ανωτέρω συστατικών σε κάθε ποικιλία, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και ωρίμανσης των σταφυλιών, μέχρι την παραγωγή του τελικού προϊόντος.

- Μελέτη όλων των παραγόντων που αφορούν την καλλιεργητική τεχνική, την πορεία ανάπτυξης και ωρίμανσης των σταφυλιών και τις οινοποιητικές τεχνικές σε σχέση με την περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος (κρασιού) σε βιολογικά δραστικά συστατικά.

- Διερεύνηση της επίδρασης των σύγχρονων εναλλακτικών (οικολογικών) μεθόδων καλλιέργειας στην περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος (κρασιού) σε βιολογικά δραστικά συστατικά

- Μελέτη αντιμεταλλαξιογόνου δράσης των συστατικών (χρωματιδιακές ανταλλαγές ανάμεσα σε αδερφές χρωματίδες) και μελέτη κυτταροτοξικότητας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές: HT-29 (καρκίνος εντέρου), T47D (καρκίνος μαστού), HeLa(καρκίνος τραχήλου μήτρας), OAW-42 (καρκίνος ωοθηκών)

- Μελέτη της επίδρασης των συστατικών *in vitro* στο σύστημα αποτοξίνωσης του οργανισμού, με τη χρήση του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων.

- Μελέτη της επίδρασης των δραστικών συστατικών στο ογκογονίδιο Ras (GTPase), σε μόρια-στόχους όπως οι κινάσες MAP (δοκιμασία κινάσης) και σε μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 (μεταγραφική δραστηριότητα). Με βάση αυτή τη μελέτη θα επιλεγούν τα συστατικά του

κρασιού που έχουν ειδική επίδραση στο βασικό ογκογονικό σήμα του καρκίνου του παχέος εντέρου, του Ras.

- Μελέτη της ξενοοιστρογόνου δράσης των βιολογικώς δραστικών συστατικών σε ορμονοευαίσθητα κύτταρα.

2.1 Μεθοδολογία Εκτέλεσης Έργου-Φάσεις Έργου

Φάση Α: *Επιλογή, συλλογή και προμήθεια φυτικού υλικού (ποικιλίες Vitis vinifera) γλεύκους και κρασιού. Παρασκευή ολικών εκχυλισμάτων και κλασματοποίησή τους. Παραλαβή και ανίχνευση των πτητικών συστατικών*

Θα μελετηθούν ήδη εντοπισμένοι αμπελώνες με τις επιλεγείσες ποικιλίες στις περιοχές της Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Κυκλάδων και Κρήτης. Σε δύο τουλάχιστον ποικιλίες οι αμπελώνες θα είναι βιολογικοί. Αντίστοιχα σε δύο τουλάχιστον ποικιλίες θα υπάρχει διαφοροποίηση στο σύστημα μόρφωσης και το κλάδεμα καρποφορίας, ενώ δύο τουλάχιστον ποικιλίες θα μελετηθούν σε διαφορετικά εδαφο-κλιματικά περιβάλλοντα. Επίσης για τις υπό μελέτη ποικιλίες θα γίνει αμπελογραφική περιγραφή και ταυτοποίηση με μοριακές μεθόδους (rapid PCR).

Οι υπό μελέτη ποικιλίες είναι : Ασύρτικο (Σαντορίνη), Ροδίτης και Μπατίκι (Τύρναβος), Βιλάνα και Λιάτικο (Σητεία), Σαβατιανό (Αττική) και τέλος Σαβατιανό και Ασύρτικο από Θήβα.

Η λήψη δειγμάτων για τις σχετικές αναλύσεις προσδιορισμού των συστατικών θα πραγματοποιείται στις εξής φάσεις ανάπτυξης και ωρίμανσης των σταφυλιών:

- 1η Στο στάδιο καρπόδεσης
- 2η Στο στάδιο του γυαλίσματος
- 3η Κατά τη πλήρη ωρίμανση
- 4η Κατά την υπερωρίμανση των σταφυλιών.

Για την παρασκευή των εκχυλισμάτων θα χρησιμοποιηθούν οργανικοί και υδατικοί διαλύτες (c-Hexane, CH₂Cl₂, MeOH), ενώ για την κλασματοποίηση των συστατικών θα χρησιμοποιηθούν χρωματογραφικές τεχνικές (υγρή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης υπό κενό ή υπό πίεση). Στην πρόσφατη βιβλιογραφία υπάρχουν πάρα πολλές αναφορές σχετικά με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται διεθνώς για να προσδιορίζεται με ακρίβεια η περιεκτικότητα των οίνων σε φαινολικά παράγωγα, τα οποία προσδίδουν στο κρασί άρωμα, γεύση και χρώμα. Από τα πολυάριθμα φαινολικά παράγωγα που περιέχουν τα κρασιά, έχουν επιλεγεί για να μελετηθούν στο ερευνητικό αυτό έργο τα πλέον ενδιαφέροντα από άποψη βιολογικής δραστηριότητας (κατεχίνη, επικατεχίνη, *trans*-ρεσβερατρόλη, *cis*-ρεσβερατρόλη, ρουτίνη, ελλαγικό οξύ, κερκετίνη, ασκορβικό οξύ, γλουταθειόνη, πτητικά συστατικά).

Ως αναλυτική μέθοδος έχει επιλεγεί η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) με στήλη C-18, αντλία gradient, ανιχνευτή diode array και το δείγμα (χωρίς προκατεργασία) θα ενίεται απευθείας στη στήλη, αφού διέλθει μία προστήλη. Ειδικά για τα δύο ισομερή της ρεσβερατρόλης, των οποίων ο διαχωρισμός με την προαναφερθείσα μέθοδο δεν είναι πάντα ικανοποιητικός, όπου χρειαστεί θα χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος αεριοχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η ίδια μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των πτητικών συστατικών του κρασιού τα οποία απομονώνονται από τα μικρής πολικότητας κλάσματα και δίνουν σε κάθε είδος κρασιού το χαρακτηριστικό του άρωμα.

Φάση Β: *Έλεγχος δραστηριότητας (screening) των ολικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων ως προς την αποτοξινωτική και αντιμεταλλαξιογόνο δράση τους. Επιλογή των δραστικών κλασμάτων*

Ειδικότερα, θα γίνει μελέτη της επίδρασης των ολικών εκχυλισμάτων στο ενζυμικό σύστημα της τρυσφωφάσης της γλουταθειόνης *in vitro*, καθώς επίσης και σε άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Συγκεκριμένες ποσότητες των παραγώγων θα προστίθενται κατά τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας ώστε να διαπιστωθεί εάν αναστέλλουν, διευκολύνουν ή δεν έχουν καμία επίδραση πάνω στη δράση του ενζύμου. Ως πηγή ενζύμου θα χρησιμοποιηθεί ήπαρ καθώς και άλλοι ιστοί αρουραίου ή ποντικού. Θα καταβληθεί προσπάθεια

να χρησιμοποιηθούν και λευκοκυτταρικοί πληθυσμοί αίματος από εθελοντές αιμοδότες. Στην περίπτωση της μεταφοράς της γλουταθειόνης θα δοκιμαστεί και η πιθανή σύνδεση των παραγώγων με το μόριο της GST σε σημείο διαφορετικό από το ενεργό κέντρο (πιθανή δράση «λιγκαντίνης» της GST έναντι των μορίων. Όσον αφορά την αντιμεταλλαξιγόνο δράση θα εφαρμοστεί η δοκιμή κατά Ames σύμφωνα με τους Maron and Ames (1983).

Φάση Γ: *Απομόνωση, ανάλυση και ταυτοποίηση των καθαρών συστατικών από τα δραστικά κλάσματα. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ταχεία ανίχνευση των συστατικών ελληνικών κρασιών*

Τα καθαρά συστατικά θα ταυτοποιηθούν με φασματοσκοπικές μεθόδους: φασματοσκοπία υπερύθρου (**IR**), φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (**UV-Vis**), φασματομετρία μάζας (**MS**), και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (**NMR**) σε συσκευές υψηλής ευκρίνειας (200 και 400 MHz). Ο ιονισμός των συστατικών κατά τη λήψη των φασμάτων μάζας θα γίνει με τις τεχνικές της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (**EI**), του χημικού ιονισμού (**CI**) και της εκρόφησης δια ηλεκτροδιάχυσης (ηλεκτροψεκασμός ή **ESI**). Οι τεχνικές αυτές δίνουν συμπληρωματικά μεταξύ τους στοιχεία, για τη δομή μιας ένωσης (Μοριακό Βάρος, χαρακτηριστικές ομάδες κλπ.) Σε περίπτωση που δεν είναι εφικτός ο καθορισμός της δομής μιας ένωσης με τις παραπάνω τεχνικές, θα εκτελεστούν πειράματα φασματομετρίας μάζας πολλαπλής τάξης (**MSⁿ**) σε διάφορες μορφές σάρωσης (precursor scan, products scan, neutral loss). Για τον καθορισμό της δομής των προϊόντων θα εφαρμοσθούν τεχνικές φασματοσκοπίας NMR μιας και δύο διαστάσεων (**1D και 2D NMR**). Στις μελέτες φασματοσκοπίας NMR θα γίνουν πειράματα ¹³C NMR και ¹H NMR μιας και δύο διαστάσεων με διαφορετικές αλληλουχίες παλμών (**DEPT, NOESY, HMQC, HMBC**) Επί πλέον, θα χρησιμοποιηθεί, για τη μελέτη της χημικής σύστασης των πτητικών συστατικών, η αέριος χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (**GC-MS και GC-MS/MS**). Επίσης, για τον έλεγχο της χημικής σύστασης των εκχυλισμάτων, των κλασμάτων τους και για την επιβεβαίωση της δομής των καθαρών συστατικών θα χρησιμοποιηθεί η τεχνική **LC-MS** (υγρή χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας).

Φάση Δ: *Μελέτη in vitro της βιολογικής δράσης των καθαρών ενώσεων (κυτταροστατική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση, επαγωγή ενζύμων αποτοξίνωσης, ξενοοιστρογόνο δράση). Επιλογή δραστικών μορίων.*

Η μεθοδολογία που θα ακολουθηθεί για τους παραπάνω προσδιορισμούς θα είναι η ακόλουθη κατά περίπτωση:

1. Προετοιμασία του ομογενοποιημάτος

Στις περιπτώσεις που θα χρησιμοποιηθεί ήπαρ αρουραίων ο ηπατικός ιστός από αρουραίους θα ομογενοποιηθεί σε 5πλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης (10 mM potassium phosphate pH 7.4, 0.25 M Sucrose, 0.2 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 25 μM PMSF). Θα ακολουθήσει φυγοκέντρηση του ομογενοποιημάτος για 30 λεπτά στα 45000 g και στη συνέχεια για 90 λεπτά στα 105000 g σε υπερφυγόκεντρο τύπου Beckmann 65. Η διαδικασία θα γίνεται είτε σε πάγο είτε στους 4 °C.

2.1. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου θα χρησιμοποιηθεί το υπόστρωμα cumene hydroperoxide.

2.2. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης

Για τον προσδιορισμό της δράσης ρεδοκτάσης (αναγωγάσης) της GSH θα ακολουθηθεί η διαδικασία όπως προτάθηκε από τους Kostaropoulos et al., (2000).

2.3. Προσδιορισμός της δράσης της δισμουτάσης του υπεροξειδίου

Ο προσδιορισμός θα γίνει φασματοφωτομετρικά με παρατήρηση στα 550nm την αναστολή της αναγωγής το κυττοχρώματος c, χρησιμοποιώντας το σύστημα οξειδάσης ξανθίνης – υποξανθίνης ως δότης του μοριακού οξυγόνου (O₂)

2.4. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της μεταφοράς της γλουταθειόνης

Θα μελετηθεί η επίδραση των διαφόρων παραγώγων πάνω στη δράση των GSTs έναντι συγκεκριμένων ηλεκτρονιόφιλων υποστρωμάτων CDNB, DCNB, TPBO και αιθακρυλικού οξέος σύμφωνα με τη μέθοδο των Habig et al. (1974) με μικρές τροποποιήσεις (Kostaropoulos et al 1998).

3. Προσδιορισμός των κινητικών χαρακτηριστικών (K_m και V_{max}) του ομογενοποιημένου και των ισοενζυμικών μορφών των GSTs και μελέτη της επίπτωσης διαφόρων παραγόντων πάνω στις ιδιότητες αυτές

Τα κινητικά χαρακτηριστικά, δηλ. η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) και η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) ως προς την GSH και το CDNB, θα προσδιοριστούν είτε σε καθαρό ένζυμο που θα προκύψει μετά από χρωματογραφία συγγένειας του ομογενοποιημένου του ήπατος είτε σε συγκεκριμένες ισοενζυμικές μορφές όπως η μορφή α και μ οι οποίες θα απομονωθούν μετά από χρωματογραφία εστιασμού του ομογενοποιημένου σε εύρος pH 4-7.

4. Χρωματογραφία εστιασμού

Με την τεχνική αυτή θα διαχωριστούν τις ισοενζυμικές μορφές με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Θα χρησιμοποιηθεί στήλη Polybuffer Exchanger 94 (0.3 x 6 cm).

5. Χρωματογραφία συγγένειας

Για την απομόνωση του ενζύμου το ομογενοποιημένο ήπατος θα περάσει από στήλη χρωματογραφίας συγγένειας GSH συνδεδεμένη με epoxy-activated Sepharose 6B. Η διαδικασία που θα ακολουθηθεί θα είναι σύμφωνα με αυτή που παρουσιάζεται από Papadopoulos et al 1989, και Kostaropoulos et al 1998.

6. Μελέτη της ανασταλτικής επίδρασης διαφόρων παραγόντων στο ένζυμο

Θα χρησιμοποιηθεί το υπόστρωμα CDNB αλλά θα εξεταστεί και η πιθανή ανασταλτική δράση των παραγόντων κατά την αντίδραση του ενζύμου με άλλα υποστρώματα όπως το DCNB, αιθακρυνικό οξύ, TPBO και cumene hydroperoxide (Brophy et al. 1989α).

Ο τύπος της αναστολής που μπορεί να προκαλούν τα παράγωγα στη δραστηριότητα του ενζύμου έναντι του CDNB αλλά και της GSH θα προσδιοριστεί σύμφωνα με διαγράμματα Lineweaver-Burk. Θα προσδιοριστεί και η τιμή της K_i , δηλ. η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα που δίδει το μέτρο της αγχιστείας του ενζύμου προς τον αναστολέα.

7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης

Για τον προσδιορισμό της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης θα ακολουθηθεί η μέθοδος σύμφωνα με Kostaropoulos et al (2000) και Anderson (1985).

8. Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης ενζύμου/παραγόντων με τη χρήση φασματοφωτομετρίας φθορισμού ώστε να εντοπιστεί πιθανή δράση λιγκαντίνης της ενζυμικής ομάδας έναντι των παραγόντων

Θα εφαρμοστεί η μέθοδος που περιγράφεται από τους Brophy et al. (1989β). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι μια ένωση, η ANS, φθορίζει όταν συνδεθεί με πρωτεΐνες.

9. Προσδιορισμός συγκέντρωσης GSTs με HPLC και Lowrel rocetts

Θα καταβληθεί προσπάθεια για τον προσδιορισμό του ισοενζυμικού προτύπου και των πιθανών μεταβολών εξαιτίας της επίδρασης των παραγόντων με τη βοήθεια HPLC σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Στην προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα διαφόρων εκχυλισμάτων και καθαρών μορίων να ασκούν αντικαρκινική δράση, προτείνεται ο συνδυασμός των παρακάτω δοκιμών:

- Χρωματιδιακές ανταλλαγές ανάμεσα σε αδελφές χρωματίδες (sister chromatid exchange)

Οι χρωματιδιακές ανταλλαγές ανάμεσα σε αδελφές χρωματίδες (XAAX) είναι η κυτταρολογική διαπίστωση της ανταλλαγής χρωματιδιακού υλικού κατά την διάρκεια της αντιγραφής σε ομόλογες περιοχές. Αν και είναι σχετικά παλιό τεστ δεν έχει πάψει να αποτελεί μια από τις πιο ευαίσθητες δοκιμές που δείχνουν την ικανότητα διαφόρων παραγόντων να προκαλούν μεταλλάξεις σε ευκαρυωτικά κύτταρα, καθώς και την δυνατότητα φυσικών ή χημικών προϊόντων να δρουν ανασταλτικά στην εμφάνιση μεταλλάξεων.

- Δοκιμασία ξενοοιστρογόνου δράσης

A) Δοκιμή επαγωγής του πολλαπλασιασμού οιστρογονοεξαρτώμενων κυττάρων (E-screen)

. Θα χρησιμοποιηθούν τα MCF-7 κύτταρα. Εάν ο πολλαπλασιασμός τους επάγεται

ανάλογα εκτιμάται και η οιστρογονική δράση της προς εξέταση ουσίας. Η δοκιμή αυτή αποτελεί μια από τις πιο αξιόπιστες αλλά δεν εξασφαλίζει τη δράση επι αρνητικού αποτελέσματος. Για αυτό θα γίνουν συμπληρωματικά και οι παρακάτω δοκιμές.

Β) Μέτρηση της επαγωγής του γονιδίου pS-2 σε κύτταρα MCF-7 . Το γονίδιο pS-2 είναι ένας δείκτης που χρησιμοποιείται σε πολλές μελέτες για να δείξει επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης από οιστρογόνα. Μόρια με οιστρογονική δράση που δεν επάγουν απαραίτητα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οιστρογονοεξαρτώμενων κυττάρων, μπορούν να αυξήσουν την έκφραση του γονιδίου pS-2. Η έκφραση θα υπολογιστεί με ανάλυση κατά Northern όπως περιγράφηκε για ορμονοεξαρτώμενα γονίδια (Kouretas D et al, 1999).

Γ) Μέτρηση της επαγωγής της έκφρασης της βιτελλογενίνης στο πλάσμα του ψαριού tilapia. Η βιτελλογενίνη επάγεται σε πολλά ψάρια που εκτίθενται σε μόρια με οιστρογόνο δράση και ανάλογα με το επίπεδο επαγωγής εκτιμάται και η ξενοοιστρογόνο δράση. Όσον αφορά στην μεθοδολογία τα πειράματα γίνονται σε μικρά ενυδρεία όπου αφήνονται τα ψάρια παρουσία των εκχυλισμάτων η των καθαρών μορίων σε διάφορες συγκεντρώσεις για 1-3 μέρες. Στη συνέχεια η βιτελλογενίνη μετράται με ELISA στο πλάσμα των ψαριών. Το αντίσωμα θα είναι της εταιρείας BIOSENSE.

Με τον συνδυασμό των παραπάνω τριών μεθόδων μπορεί να εκτιμηθεί με ασφάλεια η εμφάνιση οιστρογονικής δράσης σε ένα μόριο.

Φάση Ε: *Μελέτη του μηχανισμού δράσης των δραστικών μορίων στο ογκογονικό σήμα του καρκίνου παχέος εντέρου, με βάση την έκφραση ογκογονιδίων Ras (GTPase), κινασών (MAP) και μεταγραφικών παραγόντων (AP-1) καθώς και επίδραση στις κυτταροσκελετικές δομές. Επιλογή δραστικών μορίων.*

Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα διαφόρων εκχυλισμάτων και καθαρών μορίων του κρασιού να ασκούν δράση στο ογκογονικό σήμα του Ras, καρκινικές και προ-καρκινικές κυτταρικές σειρές εντέρου, που έχουν ενδογενή μετάλλαξη στο ογκογονίδιο K-Ras, καθώς και συστήματα επαγόμενης έκφρασης του gas θα καλλιεργηθούν και θα απομονωθούν εκχυλίσματα κυτταρικά για χρήση σε τεχνικές έκφρασης και ενεργότητας των παραγόντων-στόχων του ογκογονιδίου. Ειδικότερα θα χρησιμοποιηθούν οι εξής τεχνικές:

Στύπωμα κατά western. Προσδιορισμός της ποσότητας πρωτεΐνης σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων

Τεχνικές ενζυμικής δραστηριότητας. Οι ενεργότητες των ενζύμων Ras και Rho GTPασών, και των κινασών θα προσδιοριστούν με τη χρήση ειδικών υποστρωμάτων *in vitro*.

Τεχνικές κατακράτησης πρωτεϊνών (gel retardation assay). Η τεχνική βασίζεται στη διαφορετική κινητικότητα των συμπλόκων DNA ολιγονουκλεοτιδίων /πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου. Με την τεχνική αυτή μας δίνεται η δυνατότητα να μελετήσουμε την ενεργότητα πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στις κατάλληλες συναινετικές DNA αλληλουχίες.

Δοκιμασία CAT ή λουσιφεράσης. Με αυτές τις μεθόδους προσδιορίζεται η μεταγραφική ενεργότητα ενός γονιδίου με τη βοήθεια παραγόντων αναφοράς, όπως CAT και/η λουσιφεράση.

Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και δοκιμασία της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR). Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο αγγελιαφόρου RNA, απομονώνεται το m-RNA από τα κύτταρα και χρησιμοποιείται στη RT-PCR που βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του DNA *in vitro*. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την επιλεκτική παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που υπάρχει σε ένα σύνθετο μίγμα νουκλεϊνικών οξέων, κατά την διάρκεια μιας απλής ενζυμικής αντίδρασης.

Προσδιορισμός φαινοτυπικών χαρακτηριστικών σε σχέση με χαρακτηριστικά του κυτταροσκελετού, όπως πολυμερισμού ακτίνης και σχέση αυτών με τη κινητικότητα των κυττάρων. Για τη μελέτη ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών των κυτταροσκελετικών δομών, όπως πολυμερισμός ακτίνης, θα γίνει χρήση τεχνικών κυτταρικής βιολογίας, όπως ανοσοφθορισμός και συσχέτιση με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Φάση Ζ: *Πιλοτική εκχύλιση και απομόνωση των επιλεγμένων μορίων και in vivo μελέτη της χημειοπροστατευτικής τους δράσης σε επίμνες.*

Η πιλοτική εκχύλιση και απομόνωση των δραστικών μορίων θα γίνει με μεθοδολογία ανάλογη με εκείνη των Φάσεων Α και Γ.

Για την *in vivo* φαρμακολογική μελέτη, τα πειραματόζωα (αρουραίοι ή ποντικοί) θα διατραφούν με τα δραστικά συστατικά που θα απομονωθούν κατά την εκτέλεση των φάσεων Β & Γ για χρονικό διάστημα περίπου ενός μηνός και στη συνέχεια θα εξεταστούν τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, τα επίπεδα της μεταφοράς της γλουταθειόνης αλλά και το ισοενζυμικό της πρότυπο. Επίσης θα προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ανηγμένης αλλά και οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης ώστε να ελεγχθεί το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό θα προσδιοριστεί η επίπτωση που έχει στον οργανισμό η συγκεκριμένη ένωση, σε διάφορους ιστούς όπως είναι το ήπαρ, τα νεφρά, το πεπτικό σύστημα, το καρδιακό σύστημα κ.ά.

Τα ενζυμικά συστήματα τα οποία θα αναλυθούν θα είναι το σύστημα των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης, της καταλάσης, της δισμουτάσης, της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, του ενζύμου της φάσης Ι της αποτοξίνωσης του Ρ450 καθώς και το πολυδύναμο σύστημα των μεταφορών της γλουταθειόνης.

Φάση Η: *Επίδραση των αμπελουργικών πρακτικών και της μεθόδου οινοποίησης στην περιεκτικότητα των παραγόμενων οίνων στις εν λόγω ουσίες.*

Οι ποικιλίες Ασσύρτικο και Σαββατιανό θα μελετηθούν σε διαφορετικά εδαφοκλιματικά περιβάλλοντα (Σαντορίνη και Θήβα για το Ασσύρτικο και Αττική και Θήβα για τον Σαββατιανό).

Επίσης θα μελετηθεί η επίδραση του συστήματος μόρφωσης και του κλαδέματος καρποφορίας στις βιολογικές δραστικές ενώσεις. Τέλος πειραματικές οινοποιήσεις θα πραγματοποιηθούν ώστε να προταθούν τρόπος ή τρόποι οινοποίησης που αξιοποιούν με τον καλύτερο τρόπο το δυναμικό των σταφυλιών όσον αφορά τις βιολογικές δραστικές ενώσεις.

2.3 Προσωπικό που θα απασχοληθεί

Κατηγορία Προσωπικού	Αριθμ. ατόμων	Ανθρωπομήνες
Έμπειροι Ερευνητές	8	28,2
Νέοι Ερευνητές	5	180
Τεχνικό Προσωπικό	5	38
Σύνολο	18	246,2

2.4 Χρονοδιάγραμμα Έργου

	0	6	12	18	24	30	36
Μήνες							
Τίτλος φάσης							
A	←				→		
B	←			→			
Γ		←					→
Δ		←					→
E		←					→
Z					←		→
H				←			→
Ενδιάμεση Έκθεση Προόδου			•		•		
Υποστήριξη Διατριβής							*
Τελική Έκθεση							[]

↔ Διάρκεια σταδίου

• Υποβολή ενδιάμεσης έκθεσης προόδου

* Υποστήριξη Διατριβής

[] Υποβολή Τελικής Έκθεσης

2.5 Παραδοτέα

Φάση Α: Επιλογή, συλλογή και προμήθεια φυτικού υλικού (ποικιλίες *Vitis vinifera*) γλεύκους και κρασιού. Παρασκευή ολικών εκχυλισμάτων και κλασματοποίησή τους. Παραλαβή και ανίχνευση των πτητικών συστατικών

Φάση Β: Έλεγχος δραστηριότητας (screening) των ολικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων ως προς την, αποτοξινωτική, κυτταροστατική δράση τους. Επιλογή των δραστικών κλασμάτων.

Φάση Γ: Απομόνωση, ανάλυση και ταυτοποίηση των καθαρών συστατικών από τα δραστικά κλάσματα. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ταχεία ανίχνευση των συστατικών ελληνικών κρασιών.

Φάση Δ: Μελέτη *in vitro* της βιολογικής δράσης των καθαρών ενώσεων (κυτταροστατική και αντιμεταλλαξιγόνο δράση, επαγωγή ενζύμων αποτοξίνωσης, ξενοοιστρογόνο δράση). Επιλογή δραστικών μορίων.

Φάση Ε: Μελέτη του μηχανισμού δράσης των δραστικών μορίων στο ογκογονικό σήμα του καρκίνου παχέος εντέρου, με βάση την έκφραση ογκογονιδίων Ras (GTPase), κινασών (MAP) και μεταγραφικών παραγόντων (AP-1) και επίδραση στη δομή του κυτταροσκελετού. Επιλογή δραστικών μορίων.

Φάση Ζ: Πιλοτική εκχύλιση και απομόνωση των επιλεγμένων μορίων και *in vivo* μελέτη της χημειοπροστατευτικής τους δράσης σε επίμυες.

Φάση Η: Επίδραση των αμπελουργικών πρακτικών και της μεθόδου οινοποίησης στην περιεκτικότητα των παραγόμενων οίνων στις εν λόγω ουσίες

3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΫΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ**3 ΠΡΟΫΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΗΓΕΣ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ****3.1 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΡΟΫΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΑΝΑ ΦΟΡΕΑ και ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΔΑΠΑΝΗΣ**

	Κατηγορία	ΑΝΑΔΟ- ΧΟΣ	Ερευνητ. Φορέας 1	Ερευνητ, Φορέας 2	Ερευνητ. Φορέας 3	Ερευνητ, Φορέας 4	ΜΕΦ 1		ΣΥΝΟΛΟ σε €
							Άμεση	Έμμεση	
	ΣΤΗΛΕΣ	1	2	3	4	5	6α	6β	7
1.	Αμοιβές και έξοδα τρίτων με Δ.Π.Υ.	41288	5900	31752		--	4300		83240
1.1	Νέοι Ερευνητές	28188	--	31752	--	--	--		59940
1.2	Επιστημονικός Υπεύθυνος	--	--	--	--	--	--		--
1.3	Έμπειροι Ερευνητές		--	--	--	--	3300		3300
1.4	Τεχνικοί Έρευνας	13100	5900	--		--	--		19000
1.5	Εισηγητές σεμιναρίων με Δ.Π.Υ. / δαπάνες πιστοποίησης αποτελεσμάτων ερευνητικού έργου						1000		1000
2.	Αμοιβές και έξοδα προσωπικού (μισθωτοί)		28188	--	26208	28188	6600		89184
2.1	Νέοι Ερευνητές	--	28188	--	26208	28188	--		82584
2.2	Επιστημονικός Υπεύθυνος	--	--	--	--	--	--		--
2.3	Έμπειροι Ερευνητές	--	--	--	--	--	--		--
2.4	Τεχνικοί Έρευνας		--	--	--	--	6600		6600
3.	Διάφορα έξοδα	15056	8457	5718	11262	9282	12577		62352
4.	Ασώματες ακινητοποιήσεις και έξοδα πολυετούς αποσβέσεως	--	--	--	--	--	--		--
5.	Παροχές Τρίτων		--	--	--	--	--		--
6.	Έπιπλα & λοιπός εξοπλισμός	--	--	--	--	--	--		--
7.	Αποσβέσεις παγίων στοιχείων ενσωματωμένων στο λειτουργικό κόστος	--	--	--	--	--	--		--
	ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ	56344	42545	37470	37470	37470	23477		234776

ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ:

A) Η συμμετοχή του Αναδόχου και των συνεργαζόμενων ερευνητικών φορέων (1,2 κλπ.) καλύπτεται από την ΓΓΕΤ (Στήλη 1,2,3).

B) Η συμμετοχή των Μη Ερευνητικών Φορέων (ΜΕΦ) καλύπτεται από τους ίδιους με τρεις τρόπους:

i) άμεσα, με κατάθεση χρημάτων στον Ανάδοχο, από τον Φ.Σ. ο οποίος με την σειρά του τα κατανέμει στις κατηγορίες δαπανών (1-6) στις στήλες της άμεσης χρηματοδότησης των ΜΕΦ (4α και 5α).

ii) έμμεσα, αφενός μεν με παροχές προς το πρόγραμμα από τον ΑΜΕΦ και κατανομή τους στις κατηγορίες δαπανών 1-6 του Πίνακα, όπως π.χ. υπηρεσιών από δικό του προσωπικό (έμπειροι ερευνητές και τεχνικοί), αναλωσίμων κλπ., αφετέρου δε με χρήση ή απόσβεση εξοπλισμού κλπ. και κατανομή τους αποκλειστικά στην κατηγορία 7 (στήλες 4β και 5β).

iii) μικτός τρόπος (έμμεσα και άμεσα). Στην περίπτωση αυτή συμπληρώνονται και οι δύο στήλες στις αντίστοιχες κατηγορίες (4α-β και 5α-β).

3.1 Κατανομή Δαπανών ανά Κατηγορία και ανά Φορέα

A/α	Ονοματεπώνυμο	Απασχ.	Ποσοστό	Ισοδύναμα	Μηνιαία	Συνολική	ΦΟΡΕΑΣ
-----	---------------	--------	---------	-----------	---------	----------	--------

		(μήνες)	Απασχ.	Πλήρους Απασχ.	Αμοιβή	Δαπάνη σε €	
1.	<u>Αμοιβές και έξοδα τρίτων</u>			107		83240	
1.1	<i>Ε.Υ., Έμπειροι Ερευνητές Υποψήφιοι διδάκτορες με Δ.Π.Υ.</i>			75		63240	
1.1.1	Γεώργιος Κοτσερίδης (ΕΕ)	10	30%	3	1100	3300	Γ.Π.Α.
1.1.2	Μαρία Αναστασιάδου (ΥΔ)	36	100%	36	783	28188	Γ.Π.Α.
1.1.3	Δημήτριος Στάγκος	36	100%	36	882	31752	Π.Θ.
1.2	<i>Τεχνικό Προσωπικό με Δ.Π.Υ.</i>			32		19000	
1.2.1.	Ε. Ευεργέτης	10	100%	10	590	5900	Γ.Π.Α.
1.2.2.	Δ. Παντιώρα	6	100%	6	600	3600	Γ.Π.Α.
1.2.3.	Ε. Δαβυτίδου	6	100%	6	600	3600	Γ.Π.Α.
1.2.4.	Ε.Ευεργέτης	5	100%	5	590	2950	Ε.Κ.Π.Α.
1.2.5	Κ. Βουβογιαννοπούλου	5	100%	5	590	2950	Ε.Κ.Π.Α.
1.3	<i>Εισηγητές σεμιναρίων με Δ.Π.Υ./ δαπάνες πιστοποίησης αποτελεσμάτων ερευνητικού έργου.</i>					1000	
1.3.1	Εισηγητές σεμιναρίων με Δ.Π.Υ					1000	Γ.Π.Α.
2.	<u>Αμοιβές και έξοδα προσωπικού</u>						
2.1	<i>Ε.Υ., Έμπειροι Ερευνητές Υποψήφιοι διδάκτορες Μισθωτοί</i>			139,2		89184	
2.1.1	Σ. Χαρουτουγιάν (ΕΕ-ΕΥ)	36	10%	3,6	–	–	Γ.Π.Α.
2.1.2	Σ. Κουλοχέρη (ΕΕ)	36	10%	3,6	–	–	Γ.Π.Α.
2.1.3.	Σ. Μητάκου (ΕΕ)	36	10%	3,6	–	–	Ε.Κ.Π.Α.
2.1.4	Α.-Λ. Σκαλτσούνης (ΕΕ)	36	10%	3,6	–	–	Ε.Κ.Π.Α.
2.1.5	Γεώργιος Καζαντζόγλου (ΥΔ)	36	100%	36	783	28188	Ε.Κ.Π.Α.
2.1.6	Δ. Κουρέτας (ΕΕ)	36	10%	3,6	–	–	Π.Θ.
2.1.7	Α. Πίντζας (ΕΕ)	36	10%	3,6	–	–	Ε.Ι.Ε.
2.1.8	Φωτεινή Ψαχούλια (ΥΔ)	36	100%	36	728	26208	Ε.Ι.Ε.
2.1.9	Α. Τσαρμπόπουλος(ΕΕ)	36	10%	3,6	–	–	Μ.Γ.Φ.Ι.
2.1.10	Άννα Παληγογιάννη (ΥΔ)	36	100%	36	783	28188	Μ.Γ.Φ.Ι.
2.1.11	Ελένη Πριτσιβέλη	20	30%	6	1.100	6.600	Γ.Π.Α.
2.2	<i>Τεχνικό Προσωπικό Μισθωτοί</i>						
3.	<u>Διάφορα έξοδα</u>					62352	
3.1	<i>Αναλώσιμα, μικροόργανα, μικροσυσκευές</i>					43052	

3.1.1	Χημικά αναλώσιμα, διαλύτες, πρότυπες ουσίες	6000	Γ.Π.Α.
3.1.2	Υλικά χρωματογραφίας, στήλες HPLC, διαλύτες HPLC	3000	Γ.Π.Α.
3.1.3	Υαλικά	1500	Γ.Π.Α.
3.1.4	Αναλώσιμα υπολογιστών, εκτυπωτών	5433	Γ.Π.Α.
3.1.5	Χημικά αναλώσιμα, διαλύτες, πρότυπες ουσίες	3600	Ε.Κ.Π.Α
3.1.6	Υλικά χρωματογραφίας, στήλες HPLC, διαλύτες HPLC	3457	Ε.Κ.Π.Α
3.1.7	Χημικά αναλώσιμα, διαλύτες, πρότυπες ουσίες	2000	Π.Θ.
3.1.8	Αναλώσιμα βιοδοκιμών	1000	Π.Θ.
3.1.9	Υαλικά	818	Π.Θ.
3.1.10	Χημικά αναλώσιμα, πρότυπες ουσίες, διαλύτες	6000	Ε.Ι.Ε.
3.1.11	Αναλώσιμα βιοδοκιμών	4262	Ε.Ι.Ε.
3.1.12	Χημικά αναλώσιμα, διαλύτες, πρότυπες ουσίες	2000	Μ.Γ.Φ.Ι.
3.1.13	Υλικά χρωματογραφίας, στήλες GC, στήλες HPLC, διαλύτες HPLC	3500	Μ.Γ.Φ.Ι.
3.1.14	Υαλικά	782	Μ.Γ.Φ.Ι.
3.1.15	Αναλώσιμα για δειγματοληψίες	300	ΓΠΑ
3.2	Μετακινήσεις εξωτ.-εσωτ./ δημοσιεύσεις αποτελεσμάτων	12.500	
3.2.1	Μετακινήσεις εσωτερικού για ερευνητικούς σκοπούς (δειγματοληψίες, επίβλεψη καλλιέργειας κλπ)	2500	Γ.Π.Α.
3.2.2	Μετακινήσεις εσωτερικού για παρουσίαση αποτελεσμάτων (συνέδρια, ημερίδες κλπ)	700	Γ.Π.Α.
3.2.3	Μετακινήσεις εξωτερικού (για παρουσίαση αποτελεσμάτων-συνέδριο ή ερευνητική συνεργασία με φορέα εξωτερικού)	1000	Γ.Π.Α.
3.2.4	Μετακινήσεις εσωτερικού για ερευνητικούς σκοπούς (δειγματοληψίες, επίβλεψη καλλιέργειας κλπ)	1400	Ε.Κ.Π.Α
3.2.5	Μετακινήσεις εσωτερικού για ερευνητικούς σκοπούς (δειγματοληψίες, επίβλεψη καλλιέργειας κλπ)	900	Π.Θ.
3.2.6	Μετακινήσεις εσωτερικού για ερευνητικούς σκοπούς (δειγματοληψίες, επίβλεψη καλλιέργειας κλπ)	1500	Μ.Γ.Φ.Ι.
3.2.7	Μετακινήσεις εξωτερικού (για παρουσίαση αποτελεσμάτων-συνέδριο ή ερευνητική συνεργασία με φορέα εξωτερικού)	1500	Μ.Γ.Φ.Ι.
3.2.8	Μετακινήσεις εσωτερικού για ερευνητικούς σκοπούς (δειγματοληψίες, επίβλεψη καλλιέργειας κλπ) και συντονισμό καλλιεργητών	1000	Ε.Ι.Ε
3.2.9	Δαπάνες δημοσίευσης αποτελεσμάτων	1000	Π.Θ.
3.2.10	Δαπάνες δημοσίευσης αποτελεσμάτων	1000	Γ.Π.Α.
3.3	Άλλα Έξοδα	6200	
3.3.1	Γραφική ύλη-έντυπο υλικό	5000	ΓΠΑ
3.3.2	Έξοδα συνεδρίων-δεξιώσεων	1200	ΓΠΑ
4.	<u>Ασώματες ακινητοποιήσεις και έξοδα πολυετούς αποσβέσεως</u>		
4.1	<u>Κατοχύρωση πνευματικών δικαιωμάτων</u>		
5	<u>Παροχές τρίτων</u>		
5.1	<u>Μίσθωση αιθουσών και εξοπλισμού για σεμινάρια</u>		
5.2	<u>Άλλες παροχές τρίτων</u>		
5.2.1	έξοδα διεξαγωγής σεμιναρίων		

6.	<u>Έπιπλα και λοιπός εξοπλισμός</u>		
7.	<u>Αποσβέσεις παγίων στοιχείων ενσωματωμένων στο λειτουργικό κόστος</u>		
	ΣΥΝΟΛΟ	234776	

ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΠΡΟΫΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

1&2 ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (Λόγοι επιλογής των συγκεκριμένων ατόμων, Νέων και Έμπειρων Ερευνητών, τεχνικών έρευνας, υποψηφίων διδακτόρων, αντικείμενο απασχόλησης)

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ: Ο ΕΕ έχει πτυχίο ειδίκευσης (master) και διδακτορικό στην οινολογία/γευσισγνωσία από Πανεπιστήμια της Γαλλίας, πολλές εργασίες στον τομέα αυτό και μακροχρόνια εμπειρία σε διάφορες θέσεις και εταιρείες σχετικά με την παραγωγή ποιοτικών οίνων. Έτσι, η πρόσληψή του (με μερική απασχόληση) αναμένεται να συμβάλλει αποφασιστικά στη ποιοτική ολοκλήρωση του έργου, αφού θα επιβλέψει τις διάφορες εργασίες και θα συμμετάσχει στην προσπάθεια βελτίωσης της ποιότητας των παραγομένων κρασιών.

ΜΑΡΙΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑΔΟΥ: Η ΥΔ του ΓΠΑ έχει πτυχίο χημικού και δίπλωμα μεταπτυχιακής ειδίκευσης (Master) στην τεχνολογία τροφίμων. Έτσι έχει ιδιαίτερα αυξημένα προσόντα για να είναι σε θέση να ανταποκριθεί στην εργασία της στο ΓΠΑ σχετικά με τις αναλύσεις οίνων και σταφυλιών.

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΖΑΝΤΖΟΓΛΟΥ: Ο ΥΔ του ΕΚΠΑ έχει πτυχίο φαρμακοποιού και ερευνητική εμπειρία στη φυτοχημική μελέτη (χρωματογραφικοί διαχωρισμοί με υγρή χρωματογραφία στήλης, MPLC, HPLC, καθώς και στην αέριο χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας για την ανάλυση των πτητικών συστατικών GC-MS). Έτσι, θα είναι σε θέση να εργαστεί ερευνητικά στην απομόνωση των βιολογικά δραστικών ουσιών και την ανάκτηση αυτών από τα στέμφυλα.

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΑΓΚΟΣ: Ο ΥΔ έχει πτυχίο βιολόγου και έχει ερευνητική εμπειρία για τις *in vitro* αξιολογήσεις διαφόρων βιολογικά δραστικών μορίων. Έτσι, αναμένεται να ανταποκριθεί πολύ ικανοποιητικά στις απαιτήσεις του έργου που σχετίζονται με την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των ενώσεων και εκχυλισμάτων που εμπεριέχονται στα κρασιά.

ΦΩΤΕΙΝΗ ΨΑΧΟΥΛΙΑ: Η ΥΔ έχει πτυχίο βιολόγου και ερευνητική εμπειρία στο ΕΙΕ στον τομέα που αφορά την μελέτη του μηχανισμού δράσης διαφόρων μορίων στο ογκογονικό σχήμα του παχέος εντέρου και θα εργαστεί σε σχετικά θέματα.

ANNA ΠΑΛΗΟΓΙΑΝΝΗ: Η ΥΔ είναι πτυχιούχος του τμήματος τεχνολογίας τροφίμων του ΓΠΑ με εμπειρία σε αναλυτικές τεχνικές (και μια δημοσίευση). Επίσης έχει προϋπηρεσία σε διάφορα εργαστήρια ανάλυσης και ποιοτικού ελέγχου, προσόντα που θα την βοηθήσουν ιδιαίτερα στην εκπόνηση της διατριβής και εγγυώνται το αίσιο πέρας της.

ΤΕΧΝΙΚΟΙ: Ο μεγάλος όγκος δειγμάτων και αναλύσεων που συμπεριλαμβάνει το ερευνητικό αυτό έργο και ιδίως η εποχικότητα των εργασιών (αφού τα περισσότερα θα εκτελεστούν από Αύγουστο έως Δεκέμβριο), έχει ως απαραίτητη προϋπόθεση την πρόσληψη εποχιακών τεχνικών για να εργαστούν στον τομέα αυτόν.

3.1 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ, ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΑ, ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΕΣ (αναγκαίων για μικρής κλίμακας προσαρμογή –και όχι επέκταση- του υπάρχοντος εξοπλισμού).

Τα ποσά που αναφέρονται στον κωδικό αυτό αφορούν κατά κύριο λόγο αναλώσιμα που είναι ιδιαίτερα αυξημένα, λόγω της εργαστηριακής – αναλυτικής φύσης του έργου. Αναφέρονται δε κυρίως σε χρωματογραφικά υλικά, οργανικούς διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια, στήλες χρωματογραφίας, αναλώσιμα Η/Υ, υάλινα σκεύη κλπ. Επίσης θα απαιτηθούν αυξημένα αναλώσιμα για τις βιοδοκιμές, αφού τα υλικά τους είναι ιδιαίτερα ακριβά. Τέλος, εάν αγοραστούν μικροόργανα ή μικροσυσκευές, αυτές θα είναι πολύ μικρού κόστους (λιγότερο από 500 ΕΥΡΩ) και θα γίνουν μόνο όταν προκύψει κάποια ιδιαίτερη ανάγκη για εξειδικευμένη εργασία.

3.2 ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΕΙΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ / ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ Απαιτείται, στο βαθμό που είναι γνωστά, ο τόπος προορισμού, η διάρκεια παραμονής και ιδιαίτερα ο σκοπός τους μετακίνησης (συμμετοχή σε συνέδρια, ενημέρωση, συγκέντρωση πληροφοριών, επιτόπιες μετρήσεις ή συνεντεύξεις, κ.τ.λ). Ειδικά για μετακινήσεις εξωτερικού αιτιολογείται πλήρως η αναγκαιότητά τους μέσα στα πλαίσια του ερευνητικού έργου (π.χ. παρουσίαση ερευνητικών αποτελεσμάτων σε επιστημονικό συνέδριο).

Οι μετακινήσεις εσωτερικού είναι πιθανά αυξημένες, αλλά δικαιολογούνται πλήρως από την φύση του έργου, του οποίου η καλή έκβαση είναι ιδιαίτερα συνδεδεμένη με την συνεχή παρακολούθηση των καλλιεργειών αμπέλου και τη σωστή δειγματοληψία σε διάφορες απομακρυσμένες περιοχές της Ελλάδας.

Οι μετακινήσεις στο εξωτερικό θα γίνουν αυστηρά μόνο για δυο λόγους και μετά από πλήρη αιτιολόγηση. Ο πρώτος λόγος αναφέρεται στην ανακοίνωση αποτελεσμάτων σε διεθνές επιστημονικό συνέδριο και ο δεύτερος στην περίπτωση που θα κριθεί αναγκαίο να υπάρξει συνεργασία με ερευνητικό φορέα (πανεπιστημιακό, συνεταιρισμό ή εταιρεία) του εξωτερικού που ασχολείται με αντίστοιχα θέματα, έχει κάποια αξιόλογα αποτελέσματα ή εφαρμόζει εξελιγμένες τεχνικές.

3.2 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Έχει προβλεφθεί ένα ποσό για 600 ΕΥΡΩ για δαπάνες κατά την δημοσίευση των αποτελεσμάτων από τους Πανεπιστημιακούς φορείς και 1200 ΕΥΡΩ για δαπάνες δημοσίευσης-διάχυσης των ερευνητικών αποτελεσμάτων από την ΚΕΟΣΟΕ.

3.3 ΆΛΛΑ ΈΞΟΔΑ

Δεν υπάρχουν

4.1 ΚΑΤΟΧΥΡΩΣΗ ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΩΝ

Δεν προβλέπονται σε αυτή τη φάση

5.1 ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ (Αριθμός προβλεπόμενων σεμιναρίων / όροι πραγματοποίησης τους / μίσθωση αιθουσών και εξοπλισμού / παροχές τρίτων)

Θα γίνουν σεμινάρια για την εκπαίδευση των εκπαιδευόμενων υποψηφίων διδασκόντων και άλλων συμμετεχόντων στο πρόγραμμα, την διάχυση της τεχνογνωσίας σε άλλους εργαζόμενους και φορείς σχετικούς με την παραγωγή του κρασιού στην Ελλάδα. Σε αυτά προβλέπεται να συμμετάσχουν και το επιστημονικό προσωπικό και τα μέλη των συνεταιρισμών που απαρτίζουν τη ΚΕΟΣΟΕ, για να καλύτερη διάχυση των ερευνητικών αποτελεσμάτων. Προβλέπεται να γίνουν τουλάχιστον δυο σεμινάρια (αν και θα καταβληθεί προσπάθεια για περισσότερα). Ο χώρος διεξαγωγής τους θα είναι είτε οι Πανεπιστημιακές εγκαταστάσεις των ΓΠΑ και ΕΚΠΑ, ή οι εγκαταστάσεις της ΚΕΟΣΟΕ και έτσι δεν θα χρειαστεί να δαπανηθούν χρήματα για ενοικίαση εγκαταστάσεων και εποπτικών μέσων. Αντίθετα, προβλέπεται αμοιβή με ΔΠΥ για ορισμένους εκ των εισηγητών (σύνολο 4000 ΕΥΡΩ).

5.2 ΑΛΛΕΣ ΠΑΡΟΧΕΣ ΤΡΙΤΩΝ**6. Έπιπλα και λοιπός εξοπλισμός**

Δεν υπάρχουν

7. Αποσβέσεις παγίων στοιχείων ενσωματωμένων στο λειτουργικό κόστος: Αφορά μόνο για την έμμεση συμμετοχή των ΑΜΕΦ. Η έμμεση χρηματοδότηση μπορεί να αφορά Χρήση Εξοπλισμού (εξοπλισμός x μηνιαίο κόστος x μήνες απασχόλησης) κλπ.

Δεν υπάρχουν

3.2 Εκτίμηση Κατανομής Δαπανών ανά έτος

ΣΕ ΕΥΡΩ				
2002	2003	2004	2005	ΣΥΝΟΛΟ
19565	78259	78259	58693	234776

3.3 Το ποσό που δεν απορροφάται κατά το 2002 μεταφέρεται στο 2003, όπως και του 2003 στο 2004 και του 2004 στο 2005.

Ημερομηνία: Αθήνα 16 Δεκεμβρίου 2002.

Υπεύθυνος του έργου

Νόμιμος (ή νόμιμα εξουσιοδοτημένος)
εκπρόσωπος αναδόχου φορέα

Σέρκος Α. Χαρουτουιάν
Καθηγητής Χημείας Γ.Π.Α.

Καθηγητής Σωτήριος Αγγελίδης
Αντιπρύτανης Γ.Π.Α.