



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

XXXIV CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE E SCIENZE COGNITIVE

Il ruolo degli antociani alimentari nella regolazione del metabolismo cellulare della bilirubina

Settore scientifico-disciplinare: BIO/10 - **BIOCHIMICA**

DOTTORANDA:

Paola Pelizzo

COORDINATORE:

Prof. Tiziano Agostini

SUPERVISORE DI TESI:

Prof.ssa Sabina Passamonti

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

*“Esistono solo due cose: scienza ed opinione;
la prima genera conoscenza, la seconda ignoranza.”*

Ippocrate.

Riassunto

La bilirubina è un classico biomarcatore ematico utilizzato per lo screening di funzionalità epatica in soggetti sani e ammalati. Infatti, la bilirubina è eliminata per via epatica nella bile e quindi il suo valore nel sangue riflette la funzione del fegato.

La bilirubina a concentrazioni molto basse svolge un effetto protettivo a livello del cervello, infatti 10 nmol/L sono in grado di proteggere una coltura neuronale trattata con concentrazioni di perossido di idrogeno fino a diecimila volte maggiori, dimostrando un'azione antiossidante fino a venti volte più efficiente rispetto a quella esercitata dall' α -tocoferolo e ciò è dovuto all'azione della biliverdina riduttasi (Dore et al. 1999). La bilirubina, però, svolge anche effetti benefici indiretti a livello di altri organi, come per esempio a livello cardiovascolare esercitando un effetto protettivo contro i danni da stress ossidativo non solo a livello dei cardiomiociti, ma anche nelle cellule endoteliali e in quelle del muscolo liscio vascolare.

Un caso esemplare è dato dalla Sindrome di Gilbert, o iperbilirubinemia familiare, che è una condizione benigna, ma oggetto di dilemma diagnostico ("il soggetto ha anche un danno epatico criptico?") (Rasool et al. 2015). Per di più, i soggetti che manifestano la sindrome di Gilbert hanno una significativa riduzione del rischio di malattie cardiovascolari e metaboliche (Horsfall et al. 2013), dovuto alla positiva azione della bilirubina sulla funzione endoteliale (Maruhashi et al. 2012). Sebbene la sindrome di Gilbert sia causata da un difetto molecolare del metabolismo intra-epatico della bilirubina, una sottoclasse di soggetti Gilbert ha anche un difetto di trasporto di bilirubina dal sangue al fegato (Gentile, Persico, e Tiribelli 1990; Sticova e Jirsa 2013). Perciò, è importante migliorare le conoscenze sulla modulazione dell'uptake epatico della bilirubina. S'ipotizza che l'induzione di una sindrome di Gilbert iatrogenica possa essere una misura di riduzione del rischio di malattie cardiovascolari (McCarty 2007), diabete (C. H. Jung et al. 2014) o Parkinson (Qin et al. 2015), con notevole impatto sulla medicina pubblica.

Lo scopo di questa tesi è lo studio della modulazione della bilirubinemia basale da parte dei componenti bioattivi della dieta, come gli antociani. E' necessario, quindi, migliorare le conoscenze sulle interazioni tra uptake epatico della bilirubina e farmaci (Yang et al. 2017) o componenti della dieta. In merito a questi ultimi, è stata trovata una relazione positiva tra

quantità di flavonoidi assunta con la dieta e livelli ematici di bilirubina (Loprinzi e Mahoney 2015).

Per questi motivi l'approccio sperimentale migliore è lo studio della modulazione dell'uptake epatico della bilirubina da parte della cianidina 3-glucoside: il trasporto della bilirubina dal sangue al fegato (uptake) è la prima tappa del metabolismo epatico della bilirubina. Dati ottenuti in esperimenti di farmacocinetica risalenti al 1969-1980 indicano l'esistenza di almeno un trasportatore di membrana (Scharschmidt, Waggoner, e Berk 1975). Tuttavia, nonostante decenni di studi, esso non è ancora stato identificato. Le evidenze sperimentali ottenute recentemente su topi knockout indicano che i trasportatori appartenenti alla famiglia degli OATP non contribuiscono all'uptake epatico della bilirubina (van de Steeg, Stránecký, Hartmannová, Nosková, Hřebíček, Wagenaar, van Esch, de Waart, Elferink, et al. 2012). Una revisione sistematica della letteratura (Čvorović e Passamonti 2017a) suggerisce che si debba rivalutare la funzione del trasportatore della bilirubina noto come bilitranslocasi (TC 2.A.65.1.1), che lega la bilirubina con alta affinità (Martelanc et al. 2016; Sabina Passamonti, Cocolo, et al. 2005a) e ne media il trasporto in cellule epatiche in coltura (Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005a). La struttura primaria (L Battiston et al. 1998), secondaria (Roy Choudhury et al. 2013) e terziaria (Choudhury, Sikorska, van den Boom, Bayer, Popenda, Szutkowski, Jurga, Bonomi, Sali, e Zhukov 2015) di questo trasportatore è stata in parte definita, anche con ampio utilizzo di approcci computazionali (Roy Choudhury et al. 2015; Venko, Roy Choudhury, e Novic 2017), ma molti dettagli strutturali restano da chiarire.

In definitiva, i risultati ottenuti da questo studio potranno guidare future prove sperimentali in modelli in vivo, grazie alle conoscenze acquisite sul ruolo degli antociani alimentari nella regolazione del metabolismo cellulare della bilirubina.

Sommario

RIASSUNTO	II
INTRODUZIONE.....	5
1. LA BILIRUBINA.....	5
1.1. <i>Struttura chimica della bilirubina</i>	5
1.2. <i>Legame della bilirubina alle proteine</i>	7
1.2.1 Albumina.....	7
1.2.2 Ligandina	8
1.2.3 UnaG.....	8
1.3. <i>Analisi della bilirubina</i>	10
1.3.1. Il saggio biologico HUG	12
1.4. <i>Le proprietà redox della bilirubina</i>	15
1.4.1. La bilirubina come radical scavenger	15
1.4.2. Effetti sistemici da antiossidante endogeno	16
2. NEURODEGENERAZIONE, PATOLOGIA CEREBRALE E SINDROME DA DEMENZA	18
2.1. <i>Stress ossidativo e disturbi neurodegenerativi</i>	19
2.2. <i>Danno ossidativo e malattie conformazionali delle proteine</i>	22
2.3. <i>Bilirubina e neurotossicità</i>	23
2.4. <i>Bilirubina e neuroprotezione</i>	25
3. ANTOCIANI.....	27
3.1. <i>Biodisponibilità e problemi farmacocinetici</i>	31
3.2. <i>Proprietà antiossidanti degli antociani</i>	34
3.3. <i>Antociani e salute</i>	35
4. METABOLISMO EPATICO DELLA BILIRUBINA	36
5. MECCANISMI DI TRASPORTO NEL FEGATO	43
6. LA BILITRANSLOCASI	45
6.1. <i>Purificazione della bilitranslocasi</i>	45
6.2. <i>La struttura primaria della bilitranslocasi</i>	46
6.3. <i>Substrati della bilitranslocasi:</i>	48
6.3.1. Bilirubina	48
6.3.2. Antociani.....	49
6.4. <i>Bilitranslocasi come trasportatore di flavonoidi</i>	50

6.4.1 Nel fegato.....	50
6.4.2. Nello stomaco	51
6.4.3. Nel tratto gastrointestinale	52
6.4.4. Nel rene	52
6.4.5. Nell'endotelio vascolare	52
OBIETTIVI DELLA TESI	54
MATERIALI E METODI.....	56
1. REAGENTI ED ABBREVIAZIONI.....	56
1.1. Soluzioni.....	57
1.2. Composti utilizzati	58
1.3. Caratteristiche chimiche e farmacologiche dei composti testati.....	59
1.3.1. Cianidina 3-glucoside	59
1.3.2. Pravastatina	59
1.3.3. β -estradiolo 17 (β -D-glucuronide) sale sodico	59
1.3.4. Ketoprofene.....	60
1.3.5. Indometacina.....	60
2. MODELLO CELLULARE: LINEA CELLULARE SH-SY5Y.....	61
2.1 Linea cellulare HepG2.....	61
2.2 Saggio di trasporto cellulare della bilirubina	62
3. PREPARAZIONE DEL FEGATO ISOLATO E PERFUSO DI RATTO WISTAR	66
3.1. Vantaggi nell'utilizzo della procedura del fegato isolato e perfuso di ratto Wistar	69
3.2. I limiti tecnologici e le prospettive recenti	70
3.3. Controlli della vitalità epatica.....	70
3.3.1. Attività dell'LDH.....	70
3.3.2. Misurazione di ATP	71
3.3.3. Misurazione di albumina-FITC.....	71
3.4. Analisi degli antociani	71
4. SINTESI E PURIFICAZIONE DI HUG: UN BIORECCETTORE SPECIFICO DELLA BILIRUBINA	72
4.1. Produzione HUG	72
4.1.1. Espressione HUG.....	73
4.1.2. Estrazione HUG	74
4.1.3. Purificazione HUG.....	74
5. CONTROLLI DI QUALITÀ	77

5.1. Controllo della struttura HUG	77
5.1.1. Controllo della funzione HUG.....	77
5.2. Prova di attività di legame del biorecettore HUG con la bilirubina.....	78
5.2.1. Preparazione della soluzione stock	78
5.2.2. Preparazione della soluzione di lavoro	78
5.2.3. Dosaggio della bilirubina: preparazione della soluzione di HUG	78
5.2.4. Preparazione delle soluzioni standard di bilirubina	78
6. CURVA DI CALIBRAZIONE.....	79
6.1. Configurazione del saggio	79
6.1.1. Calcolo della concentrazione di bilirubina nell'effluente del fegato isolato e perfuso.....	79
6.1.2. Preparazione delle soluzioni di bilirubina e degli inibitori utilizzati.....	81
6.3. Analisi della bilirubina e bilirubina glucuronide nel sangue di ratto	82
6.3.1. Prelievo sangue di ratto.....	82
6.3.2. Analisi della bilirubina nel sangue intero, nel plasma e siero.....	82
6.3.3. Analisi della bilirubina glucuronide nel sangue intero, nel plasma e siero	83
6.3.4. Analisi della biliverdina nel siero di orata	83
7. ANALISI STATISTICHE.....	84
RISULTATI	85
1. ANALISI DELLA BILIRUBINA FRAZIONATA IN SOLUZIONI FISIOLOGICHE.....	85
1.1. Caratterizzazione dei lotti di HUG.....	85
1.2. Curva di calibrazione BR.....	87
1.3. Analisi della bilirubina glucuronide nell'effluente del fegato isolato e perfuso	88
1.4. Analisi delle interferenze del saggio con HUG	89
2. UPTAKE DELLA BILIRUBINA NELLA LINEA CELLULARE SH-SY5Y	90
2.1. Uptake della bilirubina nella linea cellulare HepG2	91
3. IL TRASPORTO DELLA BILIRUBINA NEL FEGATO ISOLATO E PERFUSO	92
4. ASSORBIMENTO EPATICO DELLA BILIRUBINA: L'EFFETTO DELLA CIANIDINA 3-GLUCOSIDE.....	94
4.1. Assorbimento epatico della bilirubina: il confronto tra cianidina 3-glucoside e pravastatina	97
4.2. Uptake epatico della cianidina 3-glucoside: effetto della bilirubina	99
4.3. Assorbimento epatico della bilirubina: l'effetto della peonidina 3-glucoside e della malividina 3-glucoside.....	100

5. ASSORBIMENTO EPATICO DELLA BILIRUBINA E DELLA BILIRUBINA GLUCURONIDE: L'EFFETTO DI CIANIDINA 3-GLUCOSIDE, PRAVASTATINA E β -ESTRADIOLO 17-(β -D- GLUCURONIDE)	102
<i>5.1. Comprensione dell'inibizione della cianidina 3-glucoside sull'assorbimento sinusoidale della bilirubina glucuronide</i>	105
6. ASSORBIMENTO EPATICO DELLA BILIRUBINA E DELLA BILIRUBINA GLUCURONIDE: L'EFFETTO DEI FARMACI ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI.....	108
7. ANALISI DELLA BILIRUBINA NEL SANGUE, PLASMA E SIERO DI RATTO.....	110
<i>7.1. Analisi della bilirubina glucuronide nel siero e nel plasma di ratto</i>	111
<i>7.2. Analisi della biliverdina nel siero di orata</i>	113
CONCLUSIONI	115
DISCUSSIONE GENERALE	118
BIBLIOGRAFIA	120
RINGRAZIAMENTI	148

Introduzione

1. La bilirubina

La bilirubina, è prodotta dall'uomo ad una velocità di 300 mg/die, ed è per l'80% un derivato del catabolismo del gruppo eme dell'emoglobina e per il restante 20% un derivato del catabolismo di altre emoproteine come, ad esempio, il citocromo (Paul D. Berk et al. 1969). La forma preferenziale è quella isomerica IX α . Inoltre, dato che si trova nel plasma quasi completamente associata all'albumina sierica (Jacobsen 1969), si avrà una riduzione della sua tossicità (Brodersen e Stern 1990a). La formazione del complesso bilirubina-albumina è un processo reversibile e la costante di dissociazione (K_d) risulta essere bassa e permette alla concentrazione plasmatica di bilirubina libera di rientrare nei limiti di solubilità in mezzo acquoso ad un pH di 7,4 (Frandsen e Brodersen 1986). La bilirubina non coniugata dal plasma viene rimossa dagli epatociti con un sistema selettivo ed altamente efficiente (Paul D. Berk et al. 1969). Questo meccanismo prevede l'azione congiunta di diversi fattori come: l'azione di diversi trasportatori a livello sinusoidale, l'azione di proteine citoplasmatiche leganti anioni, un efficiente sistema di coniugazione intraepatica, l'attività di UDPGA-glucuroniltrasferasi ed infine l'azione di un efficiente sistema di escrezione biliare (Conn e Fevery 1987).

La sindrome di Gilbert, per esempio, è un'iperbilirubinemia non coniugata (P. D. Berk et al. 1970), dovuta non solo ad una deficienza nell'attività dell'enzima UDP-glucuronosil transferasi (Bosma et al. 1995), ma anche a dei problemi a livello della captazione epatica della bilirubina (Persico 2001).

1.1. Struttura chimica della bilirubina

La cristallografia ai raggi X ha permesso di determinare la struttura tridimensionale della bilirubina (Bonnett, Davies, e Hursthouse 1976). Le due unità dipirroliche si trovano su due piani piegati di 100° rispetto ad un asse che passa per il carbonio C10 (figura 1). Ogni unità dipirrolica è stabilizzata da legami idrogeno che coinvolgono anche i gruppi propionil carbossilici e gli atomi di azoto del lattame e della porzione pirrolica. La conformazione a "libro" della bilirubina risulta essere quella energeticamente favorita anche in assenza di legami idrogeno ed è stato dimostrato da delle analisi conformazionali e mediante un calcolo di dinamica molecolare (Person, Peterson, e Lightner 1994) che le repulsioni steriche di non legame tra gli acidi propionici e gli anelli lattamici favoriscono proprio la suddetta

conformazione. Inoltre, i legami idrogeno intramolecolari aumentano considerevolmente la stabilità conformazionale.

Alcune delle proprietà della bilirubina sono dovute al coinvolgimento dei gruppi carbossilici nei legami idrogeno (McDonagh 1997):

- l'insolubilità in soluzione acquosa di bicarbonato
- l'elevato coefficiente di partizione olio-acqua
- la tendenza a legare l'albumina

La spettroscopia all'¹H-NMR ha permesso di stimare il pK_a dei due gruppi carbossilici ottenendo i valori di pK_a=4.22 e pK_a=4.9, quindi all'interno dell'intervallo atteso per una catena carbossilica di piccole dimensioni (Lightner, Holmes, e McDonagh 1996). Grazie a queste analisi, ad un pH fisiologico, la bilirubina si dovrebbe trovare in una forma dianionica ma scarsamente solvatata.

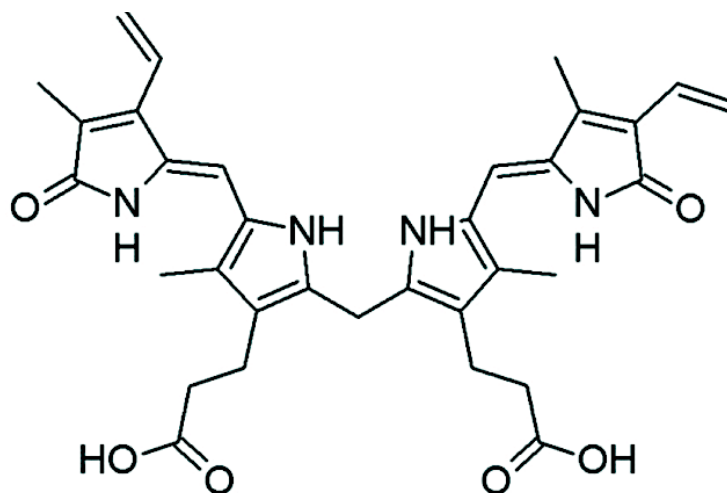


Figura 1. Struttura chimica della bilirubina. La bilirubina $\text{ix}\alpha$ è un acido tetrapirroldicarbossilico composto da due unità dipirroliche connesse da un c10 tetraedrico.

Tratto da: Tewari et al. 2017.

La bilirubina presenta una differenza sostanziale nella struttura con la biliverdina, ed è la presenza di un doppio legame tra il C9 ed il C10. In soluzione, entrambe le sostanze esistono prevalentemente sotto forma di due conformeri: una specie disposta ad elica, in cui l'anello D sovrappone l'anello A, ed una forma aperta (Braslavsky et al. 1991).

I numerosi gruppi ossidrilici della bilirubina si pensa interagiscano con le serine presenti nel sito di legame della bilitranslocasi (motivo EDSQGQHLSSF) riuscendo a competere in modo efficiente per poter formare il legame proteina-pigmento, causando una diversa conformazione della bilirubina, ideale per l'interazione con il trasportatore (Person, Peterson, e Lightner 1994).

1.2. Legame della bilirubina alle proteine

1.2.1 Albumina

La bilirubina non coniugata è scarsamente solubile in acqua, quindi viene trasportata in circolo per il 90% legata all'albumina ed il restante 10% principalmente legata all'apolipoproteina D nelle lipoproteine ad alta densità (HDL) (Vitek e Ostrow 2009). L'albumina sierica è altamente solubile ed abbondante nel plasma, essa è presente ad una 0.6mM negli adulti sani (Zunszain et al. 2008a). Il legame con l'albumina può influenzare non solo il loro trasporto attraverso l'organismo, ma anche la loro disponibilità e velocità di eliminazione; inoltre, può determinare un effetto negativo sulla filtrazione glomerulare. L'albumina si lega con un'affinità superiore alla bilirubina rispetto al legame con altri farmaci e composti endogeni. Questo legame modula la velocità con cui la bilirubina non coniugata si distribuisce tra gli spazi plasmatici e tissutali (D. Levitt e Levitt 2014).

L'albumina lega la bilirubina in modo reversibile mediante diverse forze non covalenti, come il legame salino, i legami idrogeno, le attrazioni di van der Waals e le interazioni idrofobiche (Chen et al., 2007). L'albumina sierica umana ha un sito primario ad alta affinità in cui i gruppi COO^- (carbossilato) del dianione bilirubina non coniugato interagiscono attraverso legami ionici con i gruppi terminali $-\text{NH}^+$ (ammino) di due residui di lisina in una tasca idrofoba. Tuttavia, l'albumina presenta anche un sito con minore affinità capace di legare dove può la bilirubina non coniugata, con una costante di affinità di 1/15 di quella del sito primario (Vitek e Ostrow 2009).

L'albumina sierica umana è una proteina plasmatica solubile formata da tre domini elicoidali strutturalmente omologhi (I, II e III), costituiti da due sottodomini ciascuno (A e B) (Zunszain et al. 2008). Nonostante non sia stato ben caratterizzato il sito di legame primario per la bilirubina si pensa che entrambi i sottodomini IIA e IB possano essere siti ad alta affinità. Sono state utilizzati farmaci noti, capaci di legare l'albumina e grazie all'aiuto di questi farmaci sono state effettuate analisi cristallografiche e saggi di spostamento del legame in grado di capire se

la bilirubina venisse spostata o meno dal suo sito di legame ad alta affinità. Il legame reversibile tra albumina e bilirubina può essere spezzato istantaneamente quando la bilirubina libera viene prelevata dallo spazio extracellulare; dove vi è comunque la presenza di una frazione costante di bilirubina libera non coniugata, capace di garantire l'equilibrio tra bilirubina legata e non legata. Il legame con l'albumina stabilizza la bilirubina non coniugata, evitandone l'ossidazione. (Calligaris et al., 2007).

Anche la bilirubina coniugata sembrerebbe legarsi in modo non covalente all'albumina e nel medesimo sito della bilirubina non coniugata, però i valori esatti della costante di affinità non sono stati determinati, anche se sembrerebbero essere inferiori a quelli della bilirubina non coniugata (Vitek & Ostrow, 2009).

1.2.2 Ligandina

All'interno dell'epatocita la diffusione della bilirubina libera è facilitata dal legame con delle proteine citosoliche, ovvero con la ligandina (i.e. Glutathione-S-Transferase, GST) e la fatty acid binding protein 1 (FABP1), che evitano la retrodiffusione passiva nel torrente ematico.

La ligandina (i.e. Glutathione-S-Transferase, GST) o proteina Y appartiene ad una superfamiglia di proteine multifunzionali ed è l'isoforma α del glutathione S-transferasi B. Le ligandine sono il 5% a livello citoplasmatico e hanno un'alta affinità per l'UCB, simile a quello dell'HSA. Esse grazie al legame con la bilirubina nel citosol sono in grado di:

1. Garantire un gradiente di concentrazione tra l'ambiente intracellulare ed extracellulare;
2. Limitare la retrodiffusione;
3. Ridurre la penetrazione nelle membrane degli organuli intracellulari.

Grazie alle proprietà delle ligandine è possibile ridurre possibili fenomeni di tossicità da accumulo.

La proteina FABP1, detta anche proteina Z, rispetto alla ligandina possiede una maggiore attività di legame in vitro ma minore affinità per la bilirubina. Infatti, la proteina Z lega gli acidi grassi a lunga catena e ne facilita i movimenti intracellulari (Vitek e Ostrow 2009).

1.2.3 UnaG

UnaG è una proteina fluorescente scoperta nell'Anguilla japonica (Kumagai et al., 2013), ha un peso molecolare di 15.6 kDa. Essa appartiene alla famiglia delle proteine leganti gli acidi grassi (FABP) ed è localizzata principalmente nelle fibre muscolari dell'anguilla vitrea giapponese. La principale caratteristica di UnaG è che la sua fluorescenza deve essere attivata da un ligando endogeno. La bilirubina, però, può assorbire efficacemente la luce blu, ma non può emettere fluorescenza e nemmeno UnaG può emettere fluorescenza autonomamente. Tuttavia, quando la proteina è legata alla bilirubina, tramite l'eccitazione a 497 nm si ha un'emissione di fluorescenza verde a 527 nm, sia in condizioni di normossia che di ipossia (Kumagai et al., 2013). Quando UnaG si lega alla bilirubina si forma la HoloUnaG, struttura caratterizzata da dieci fogli β e due α -elici corti (**figura 2**)(Kumagai et al. 2013).

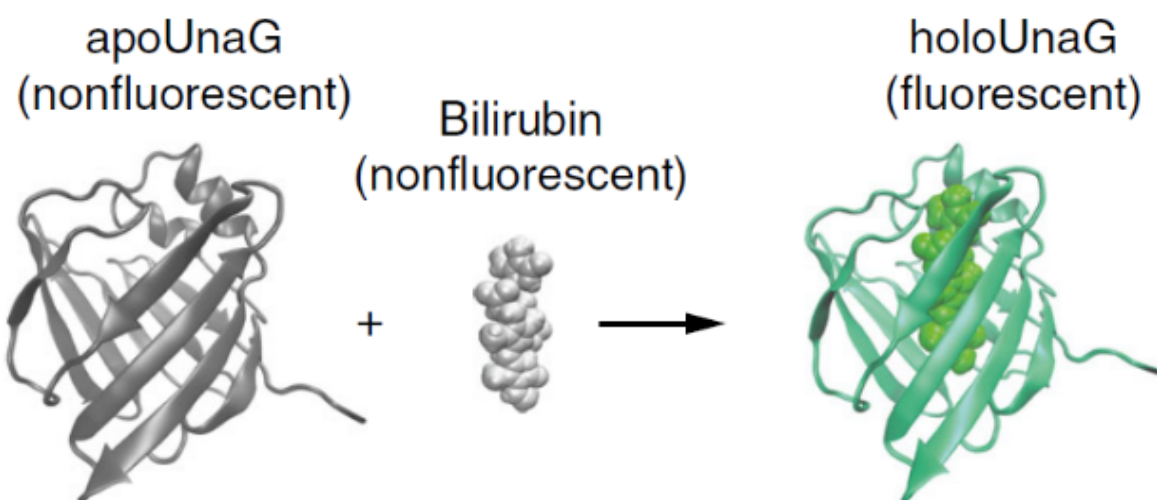


Figura 2. Struttura primaria di HoloUnaG. HoloUnaG derivante dal legame tra apoUnaG e bilirubina, entrambe molecole non fluorescenti. Tratto da:Kwon et al. 2020.

La bilirubina si lega ad apo-UnaG formando legami idrogeno attraverso molecole d'acqua ben ordinate. Il complesso holo-UnaG ha una resa quantica di fluorescenza di 0.51 ed è stabile a pH 4-11 (Kumagai et al., 2013). Uno studio dimostra come l'intensità di fluorescenza di UnaG in presenza di bilirubina non coniugata aumenta in modo dose-dipendente da 0 a circa 70 mg/dl in modo lineare, con l'intensità di fluorescenza saturata circa 10 minuti dopo la miscelazione (Iwatani et al., 2016). Durante questi 10 minuti holo-UnaG assume due stati differenti con diversa intensità di fluorescenza. Il primo stato si forma immediatamente dopo il legame della bilirubina, poi in seguito a reazioni intramolecolari reversibili si passa allo stato più luminoso,

dovuto al cambiamento delle condizioni ambientali che circondano la bilirubina (Shitashima et al., 2017).

La bilirubina può essere degradata dalla luce e dall'ossigeno, ma il legame con UnaG può rallentare significativamente questo fenomeno (Kumagai et al., 2013). D'altra parte, il complesso holo-UnaG è formato da interazioni non covalenti, quindi può andare incontro al distacco del cromoforo bilirubina decomposto e può legarsi nuovamente ad un'altra molecola di bilirubina. La cinetica di dissociazione del complesso holo-UnaG può essere dovuta sia dalla luce che dall'ossigeno, tramite reazioni di fotoisomerizzazione e di fotoossidazione, che possono portare al fotosbiancamento (Kwon et al., 2020).

Le proteine fluorescenti sono considerate strumenti utili nella ricerca biomedica. UnaG può essere utilizzata per identificare la distribuzione della bilirubina nelle cellule, per indagare sull'attività dei trasportatori di membrana, come indicatore fluorescente delle interazioni proteina-proteina, per studiare le condizioni di ipossia nei tessuti (Kwon et al., 2020) e per misurare direttamente i livelli sierici di bilirubina non coniugata. Inoltre, esistono almeno tre ordini di grandezza di differenza nell'affinità della bilirubina per l'apo-UnaG o l'albumina sierica umana, considerando K_d 98 pM e un intervallo di 10-103 nM, rispettivamente. Quindi se UnaG e l'albumina sierica umana sono presenti ad una concentrazione simile, la bilirubina non coniugata sarà totalmente legata alla prima piuttosto che alla seconda (Kumagai et al., 2013).

1.3. Analisi della bilirubina

In clinica sono state sviluppate diverse tecniche per la rivelazione della bilirubina in campioni biologici. Il metodo maggiormente utilizzato la diazoreazione, che si basa sulla reazione di van den Bergh, che trasforma la bilirubina nel siero in azoderivati colorati, facilmente quantificabili mediante il loro picco di assorbanza. Utilizzando questa tecnica si può determinare la bilirubina totale e quella coniugata, detta bilirubina diretta, inoltre, tramite la sottrazione della prima frazione rispetto la seconda frazione si ottiene la bilirubina non coniugata, chiamata bilirubina indiretta. La bilirubina coniugata produce un colore immediato dopo l'aggiunta del reagente azoico, grazie alla minore affinità per l'albumina ma maggiore solubilità per il siero. La bilirubina indiretta ha bisogno di un acceleratore che garantisca la solubilizzazione nell'ambiente di reazione, ma anche la rottura del legame con l'albumina, in modo da poter rilevare la quantità totale di bilirubina nel campione. La reazione è altamente influenzata dalle

variazioni del pH: in ambiente acido il pigmento diventa rosso, in ambiente alcalino diventa blu. Inoltre, possono essere utilizzati diversi acceleratori, come metanolo, caffeina, sodio benzoato o sodio dodecilsolfato. Emoglobina, farmaci ed emulsioni lipidiche possono causare torbidità ed impedire che avvenga la reazione di diazo.

Un altro metodo ampiamente utilizzato è basato sulla reazione enzimatica che catalizza l'ossidazione della bilirubina a biliverdina. Questa reazione utilizza come agente ossidante l'acido vanadico e viene misurata la diminuzione della densità ottica che è proporzionale alla quantità di bilirubina, che è presente inizialmente nel campione. La bilirubina totale viene ossidata a biliverdina dagli acidi vanadici in presenza di detergente, successivamente viene ossidata ancora per formare molecole incolori (Ameri et al., 2011).

Un'altra tecnica che può essere utilizzata per il rilevamento diretto della bilirubina non coniugata nei campioni è la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Un HPLC in fase inversa, invece, può consentire l'analisi di bilirubina nella bile, può separare la bilirubina monoglucuronide e diglucuronide (Rawal et al., 2020).

L'elettroforesi capillare, invece, è un metodo in grado di quantificare sia la bilirubina libera quella associata con l'albumina, in un piccolo campione. Un miglioramento di questa tecnica si è ottenuta grazie all'uso combinato dell'analisi frontale (FA), capace di scindere la bilirubina libera dal complesso formato con l'albumina. Inoltre, è stato associato anche un chip microfluidico in PMMA (polimetilmetacrilato), che utilizza un canale preconizionato, che consente quattro corse elettroforetiche, che permettono di studiare l'interazione della bilirubina con l'albumina (Rawal et al., 2020).

Un altro metodo molto usato è quello elettrochimico basato sull'amperometria. Possono essere utilizzate diverse tecniche, sia enzimatiche che non enzimatiche, per generare un segnale amperometrico. Questo metodo utilizza l'enzima bilirubina ossidasi (Box), che permette di determinare la quantità di bilirubina ossidata nel campione, mediante il monitoraggio della concentrazione di H_2O_2 causata da Box o mediante la misura indiretta della liberazione di O_2 attraverso un elettrodo di ossigeno. Questa reazione è inefficace in diverse condizioni ambientali, infatti sono stati sviluppati diversi metodi non enzimatici per migliorare la reazione. Possono funzionare attraverso l'ossidazione diretta della bilirubina sulla superficie dell'elettrodo (Silvestrini et al., 2014) o con tecniche di imprinting molecolare (MIP) (Ngashangva et al., 2019).

Infine, sono molto utilizzate anche diverse tecniche spettroscopiche, che sono affidabili e precise. Sono stati sviluppati diversi metodi, che sfruttano reazioni enzimatiche, metalli inorganici e coniugati, sonde fluorescenti di diversa natura e nanoparticelle di ZnO per migliorare l'analisi della fluorescenza. Infine, anche le tecniche di chemiluminescenza possono essere eseguite con elevata sensibilità (Ngashangva et al., 2019).

1.3.1. Il saggio biologico HUG

In questo laboratorio è stata sviluppata la proteina HUG bifunzionale come nuovo strumento per la quantificazione della bilirubina. Grazie al legame tra HUG e bilirubina non coniugata, si ottiene un segnale di fluorescenza proporzionale alla bilirubina presente nel campione. HUG è composto da due frazioni: la prima chiamata UnaG, che, come descritto precedentemente, è una proteina fluorescente, che appartiene alla famiglia delle proteine leganti gli acidi grassi (FABP) ed è espressa nelle fibre muscolari delle anguille giapponesi (*Anguilla japonica*).

La seconda chiamata HELP, che è una macromolecola di 45kD, costituita da domini di reticolazione ed idrofobici alternanti tra loro (figura 3), grazie ai quali assume la capacità di aggregarsi in risposta al cambiamento di temperatura e di formare matrici biomimetiche simili all'elastina naturale (Bandiera et al. 2006).

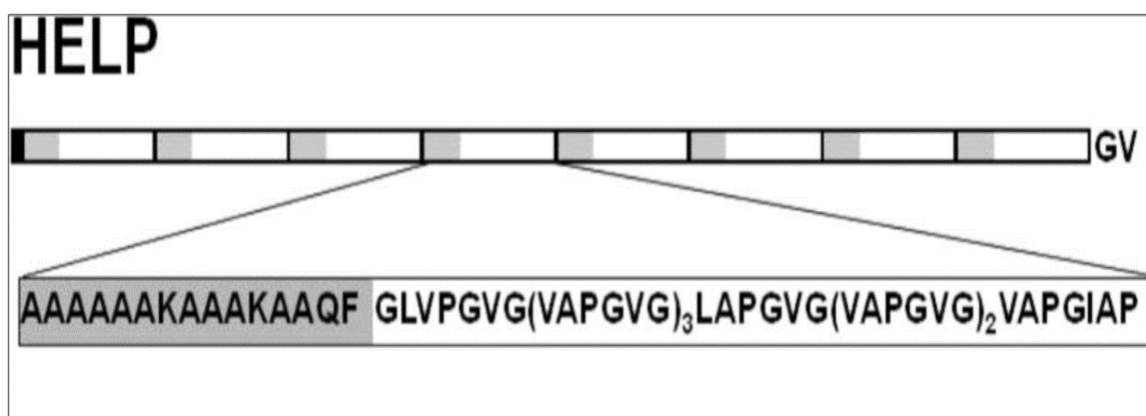


Figura 3. Struttura primaria di HELP. Dominio cross-linking in grigio; sequenze ripetute idrofobiche in bianco. Tratto da: Bandiera, Sist, e Urbani 2010.

Le proprietà proprie di HELP sono: biocompatibilità, biodegradabilità ed incapacità di indurre una risposta immunitaria, per questo le sue sequenze possono essere facilmente introdotte nei vettori batterici. Questi polipeptidi, come già accennato, sono caratterizzati da un

comportamento termosensibile: al di sopra della temperatura di transizione di fase (T_t) formano aggregati insolubili, mentre al di sotto di questa temperatura sono solubili in soluzioni acquose (figura 4) (Kowalczyk et al. 2014). Questa caratteristica permette di purificare e liofilizzare facilmente una grande quantità di prodotto, sfruttando HELP come partner di fusione per l'espressione di proteine ricombinanti.

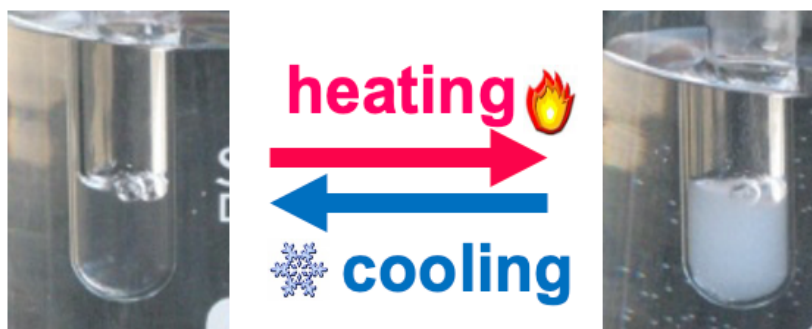


Figura 4. Comportamento termosensibile di HELP. Sopra della temperatura di transizione di fase (T_t) formano matrici biomimetiche, mentre al di sotto sono solubili in soluzioni acquose.

Tratto da: Bandiera 2011.

Per questo motivo, i biopolimeri di HELP possono esser facilmente utilizzati in campo biomedico e biotecnologico per scopi di drug o gene delivery o come rivestimento per colture cellulari (figura 5).

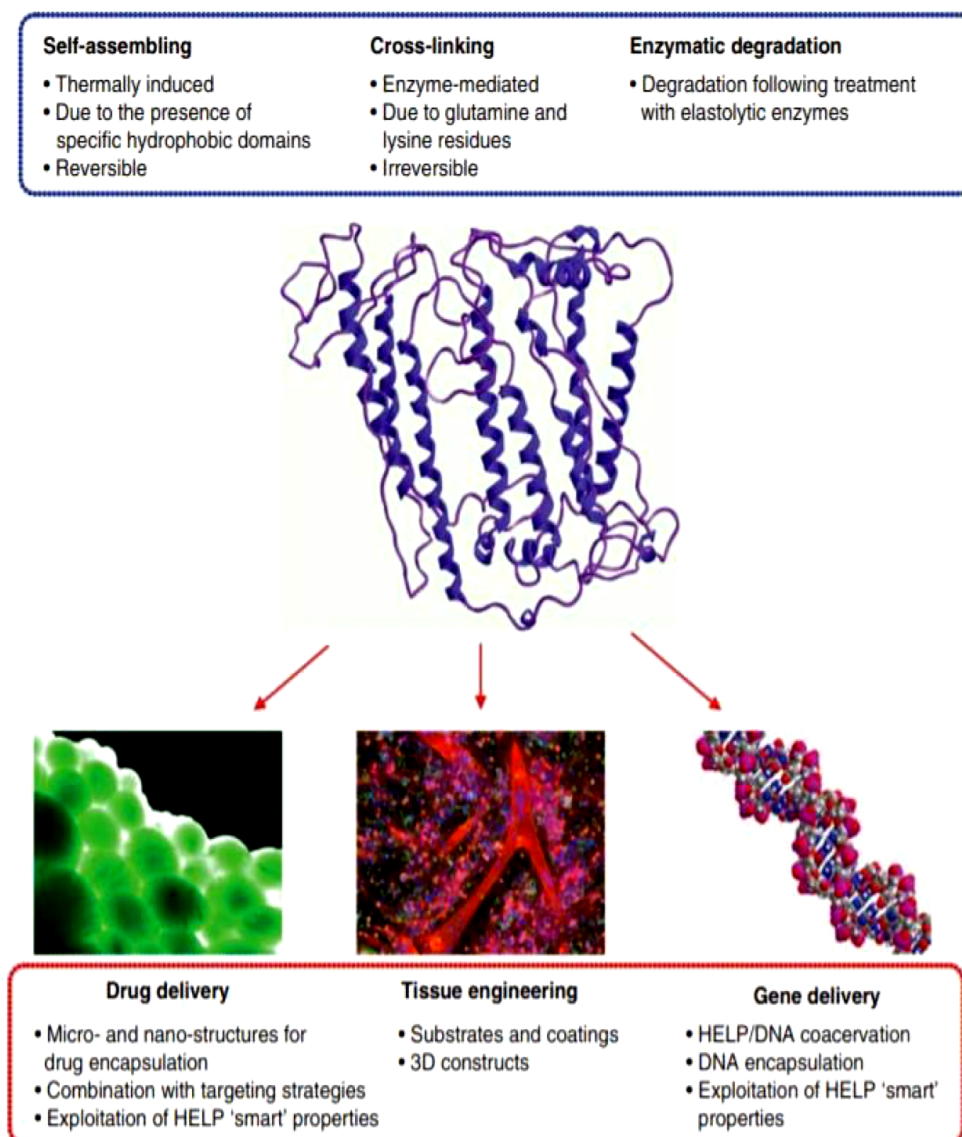


Figura 5. Applicazione di HELPs. Tratto da: da Ciofani et al. 2014.

Le caratteristiche sia di HELP che di UnaG li hanno resi estremamente promettenti per la produzione di biomateriali biocompatibili, sicuri e innovativi. Per queste versatili proprietà, nel nostro laboratorio è stato realizzato il prodotto di fusione HELP-UnaG (HUG) di circa 60 kDa (figura 6), avente due opposte funzioni: la frazione HELP dà la possibilità di creare un scaffold 3D solido, mentre la porzione UnaG può consentire, per esempio, di rilevare la bilirubina a livello cellulare, direttamente nei terreni di coltura (Bandiera et al. 2020) oppure in matrici biologiche (sangue, plasma, siero, effluente del fegato isolato e perfuso).

Inoltre, è stata valutata la capacità di legame di HUG, con un valore K_d calcolato di 1,7 nM (Bandiera et al. 2020), superiore a quello riportato per l'albumina sierica (Petersen et al. 2000).

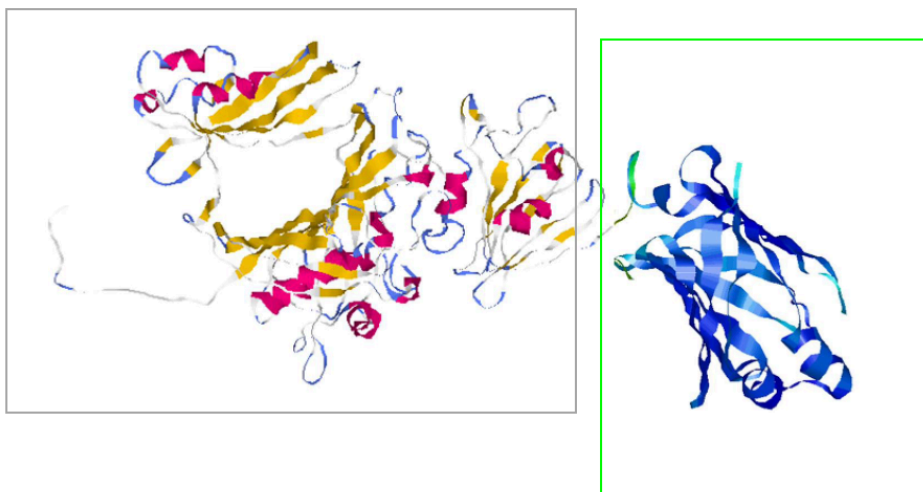


Figura 6. Rappresentazione schematica della proteina di fusione HELP (riquadro a sinistra)
- UnaG (riquadro a destra) (HUG).

Infine, l'utilizzo di HUG permette di superare alcuni limiti di altre tecnologie meno recenti. Infatti, a differenza delle tecniche che utilizzano proteine GFP, il nostro biosensore può essere utilizzato anche in condizioni anaerobiche, permettendo una stima della bilirubina più accurata rispetto ai metodi tradizionali basati sulla HPLC (High Performance Liquid Materials and methods Chromatography) o sulla diazo-reazione, quest'ultima è una tecnica poco sensibile che viene utilizzata negli ospedali per misurare la bilirubina diretta e totale, ma non può essere eseguita nella routine clinica per la misurazione della bilirubina diretta.

1.4. Le proprietà redox della bilirubina

La bilirubina è molto importante da un punto di vista fisiologico, infatti il catabolismo dell'eme, con la conseguente eliminazione del pigmento, avviene mediante un processo ad elevato consumo energetico sia nell'uomo che negli animali. Infatti, la bilirubina ha un effetto citoprotettivo a bassa concentrazione sieriche (Stocker et al. 1987). Il 10 % dell'attività antiossidante totale in un adulto, deriva da una concentrazione plasmatica di bilirubina normale. Ciò nonostante, nei neonati l'attività è maggiore e questo suggerisce una correlazione diretta tra la capacità antiossidante plasmatica e la concentrazione del pigmento.

1.4.1. La bilirubina come radical scavenger

La bilirubina si comporta come un radical scavenger sia in vitro che in vivo, svolgendo un'azione antiossidante contro le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questa proprietà viene

potenziata dal ciclo redox dovuto alla presenza della biliverdina, infatti, grazie all'azione della biliverdina riduttasi si rigenera continuamente la UCB. Si è osservato che una sola mole di pigmento può neutralizzare due moli del radicale perossido; quindi, basse concentrazioni di bilirubina possono proteggere la cellula da concentrazioni molto maggiori di ROS.

La bilirubina è un radical scavenger grazie alla capacità di donare l'atomo di idrogeno reattivo presente sul C10, trasformandosi così in un radicale del carbonio stabilizzato per risonanza. Il legame con l'albumina protegge quest'ultima dal danno da stress ossidativo che potrebbe arrecare la bilirubina, ma senza ridurne la sua attività. Uno studio in vitro ha dimostrato che quando la bilirubina è legata all'albumina sierica bovina (BSA) viene ossidata con velocità decrescenti nel seguente ordine: da radicale ossidrilico ($\bullet\text{OH}$), a idroperossido ($\bullet\text{HO}_2$) ed infine in anione superossido ($\bullet\text{O}_2^-$) (Neužil & Stocker 1993).

La bilirubina protegge anche dallo stress nitrosativo (Mancuso et al. 2003): la produzione e/o il rilascio di NO, dopo essersi legato all'anione superossido, forma il perossinitrito, quest'ultimo induce la HO-1 che porta ad un aumento della concentrazione di UCB. Tale studio dimostra, però, che l'aumento di UCB potenzia l'induzione della HO-1 mediata dall'ossido nitrico, amplificando l'effetto protettivo contro ROS e RNS mediante un loop regolatorio (Foresti et al. 2003). Inoltre, uno studio condotto da Barone et al., mediante l'utilizzo della spettrometria di massa e ultravioletta, ha rivelato che l'ossido nitrico si lega alla BR formando un derivato N-nitroso (BR-ossido nitrico). La formazione di questo composto ha fornito nuove informazioni sulla caratteristica antiossidante del BR attraverso la sua interazione con l'ossido nitrico, un neurotrasmettitore gassoso con un noto duplice effetto, vale a dire neuroprotettivo in condizioni fisiologiche o neurotossico se prodotto in eccesso, e hanno proposto il BR-ossido nitrico come nuovo biomarcatore di stress ossidativo/nitrosativo (Barone et al. 2009).

1.4.2. Effetti sistemici da antiossidante endogeno

Alti livelli di bilirubina sierica possono causare patologie come: l'arteriosclerosi, malattie del sistema cardiovascolare e danni da stress ossidativo, compresi alcuni tumori maligni, malattie autoimmuni e neurodegenerative; invece, concentrazioni molto basse (nell'ordine del nanomolare) di UCB svolgono un'azione neuroprotettiva. In particolare, 10nmol/L di UCB possono proteggere le cellule neuronali da concentrazioni diecimila volte maggiori di perossido di idrogeno, garantendo un'azione antiossidante fino a venti volte più efficiente rispetto all' α -tocoferolo e ciò avviene grazie alla biliverdina riduttasi che converte rapidamente la

biliverdina in bilirubina (Dore et al. 1999). Ma basse concentrazioni di bilirubina in astrociti murini sembrerebbero che portino all'upregulation dell'espressione di MRP1 e la traslocazione del trasportatore dal Golgi alla membrana, incrementando l'efflusso del pigmento (Gennuso et al. 2004). Altri effetti benefici della bilirubina li troviamo:

- Nelle cellule muscolari lisce dell'apparato respiratorio umano, in cui basse concentrazioni di UCB (1 μ M) inibiscono la fosforilazione delle MAP chinasi 1 e 2 coinvolte nella trasduzione del segnale, la produzione di ROS e la proliferazione cellulare dovuta a mitogeni (Taillé et al. 2003). Quest'ultimo fenomeno è tipico dei pazienti che soffrono d'asma;
- A livello del sistema cardiovascolare, dove l'UCB interagisce con l' α -tocoferolo delle LDL, evitando l'ossidazione, e riducendo l'aterogenesi, ovvero lo sviluppo dell'aterosclerosi e la formazione di ateromi;
- A livello cardiovascolare, dove la bilirubina esercita una funzione protettiva nei cardiomiociti, ma anche nelle cellule endoteliali e in quelle del muscolo liscio vascolare. Infatti, pazienti affetti dalla sindrome di Gilbert, quindi iperbilirubinemici, presentano una bassa incidenza di cardiopatie ischemiche. Inoltre, è stato studiato l'effetto di basse concentrazioni di UCB (~100 nM) in ratti in cui è stato indotto il danno da ischemia e riperfusione e si è osservata una riduzione della lesione mitocondriale e quindi una riduzione della gravità dell'infarto (Clark et al. 2000);
- A livello dei monociti, dove la bilirubina riduce lo stress ossidativo e la conseguente formazione dei trombi vascolari (Lindenblatt et al. 2004);
- A livello epatico la bilirubina può avere sia un effetto protettivo che tossico: protettivo come nel caso nei ratti pretrattati con biliverdina che induce ad un aumento dell'UCB che determina un effetto antiossidante nei confronti dell'epatotossicità indotta dal paracetamolo (Chiu, Brittingham, e Laskin 2002), mentre in caso di insufficienza epatica l'azione radical scavenger della UCB riduce l'attività battericida dei neutrofili causando delle complicanze settiche (Arai et al. 2001);
- A livello antinfiammatoria: alte concentrazioni inibiscono la formazione di citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina 2 (IL-2), il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e l'interferone γ (IFN γ). L'azione inibitoria sembrerebbe causata dalla dissociazione mediante fosforilazione del fattore nucleare kappa B (NF- κ B), normalmente legato al suo inibitore I κ B, a livello plasmatico. Questa dissociazione provoca la traslocazione di NF- κ B nel nucleo dove regola la trascrizione ed il rilascio

delle citochine pro-infiammatorie: è possibile che la bilirubina prevenga la fosforilazione dell'inibitore (Vrhovski e Weiss 1998).

2. Neurodegenerazione, patologia cerebrale e sindrome da demenza

L'Associazione Alzheimer (Prince et al. 2014) descrive la demenza come "un gruppo di disturbi che causano un declino cognitivo irreversibile come risultato di vari meccanismi biologici che danneggiano le cellule cerebrali".

Questa definizione definisce molto bene i disturbi neurodegenerativi, dove i neuroni a causa di un malfunzionamento biologico, vengono persi. Tuttavia, sebbene siano conosciute molte condizioni neurodegenerative, non esiste una netta differenza tra questi disordini (Ubhi et al. 2010). Ad esempio, sintomi come disturbi motori, allucinazioni, perdita di memoria e agitazione possono verificarsi in diversi tipi di malattie neurodegenerative. Però, non sono né stati indentificati dei biomarcatori diagnostici del danno cerebrale correlato alla demenza (Frisoni et al. 2013), né i meccanismi che collegano questo danno ai sintomi della demenza (Savva, Forster, e Matthews 2009).

Pertanto, le diagnosi cliniche sono generalmente basate su valutazioni qualitative dei sintomi.

Similmente ai disordini che si verificano in patologie croniche come malattie cardiovascolari e cancro, anche la perdita neuronale nei disturbi neurodegenerativi inizia decenni prima dell'insorgere dei sintomi clinici. Infatti, durante questo processo di neurodegenerazione patologica progressiva, il cervello può essere capace di "tamponare" e mantenere una funzione cognitiva accettabile fino alla comparsa dei sintomi gravi (McDowell et al. 2007; Moreira et al. 2010).

I quattro tipi più comuni di demenza in ordine di frequenza sono: Alzheimer, demenza vascolare, demenza da corpi di Lewy e demenza frontotemporale. Però, diversi studi neuropatologici si contrappongono al concetto di "una malattia, una patologia": le patologie miste sono molto più comuni di quelle "pure" (Langa, Foster, e Larson 2004; «Pathological Correlates of Late-Onset Dementia in a Multicentre, Community-Based Population in England and Wales» 2001) (Schneider et al. 2007). Infatti, il cervello di individui con una forma di

neurodegenerazione può avere marcatori patologici di un'altra forma, perché due disturbi possono condividere sia i fattori di rischio che quelli patologici.

Da un lato l'invecchiamento è un importante fattore di rischio per le malattie neurodegenerative dall'altro la neurodegenerazione sembra determinare un invecchiamento accelerato o disfunzionale (Prince et al. 2014). Ipercolesterolemia, ipertensione, aterosclerosi, malattia coronarica, fumo, obesità e il diabete sono anche legati allo sviluppo di neuropatologie perché sono fattori di rischio vascolare che influenzano però anche l'effettivo apporto di sangue al cervello (Luchsinger e Mayeux 2004; Shobab, Hsiung, e Feldman 2005). Altri fattori di rischio sono un'elevata assunzione di sale (Gandy e DeKosky 2013) (Gandy e DeKosky 2013) e di grassi saturi e insaturi (Gillette-Guyonnet et al. 2007).

Differenti studi suggeriscono che rispetto agli adulti con la demenza, le persone anziane con normali funzioni cognitive tendono a consumare una dieta più sana cioè più ricchi di frutta e verdura e hanno un maggiore apporto di omocisteina, che è correlata alla presenza di vitamine (vitamina B12 e folato) e antiossidanti come flavonoidi e omega-3 polinsaturi (Blennow, de Leon, e Zetterberg 2006; Luchsinger e Mayeux 2004). Da questa prospettiva, negli ultimi anni è emerso che la demenza può essere prevenuta attraverso la modifica di fattori ambientali e comportamentali (Standridge 2004).

2.1. Stress ossidativo e disturbi neurodegenerativi

Tutti i disturbi neurodegenerativi sono caratterizzati dalla progressiva atrofia dei neuroni. Nonostante i meccanismi responsabili della morte neuronale non sono ancora del tutto chiari, i numerosi progressi nel settore della biologia, hanno permesso una comprensione più dettagliata dell'invecchiamento e della neurodegenerazione da accumulo. Molti studi hanno indentificato come caratteristica biochimica principale della atrofia, un accumulo sbilanciato di stress ossidativo legato alla disfunzione mitocondriale (Folbergrová, Otáhal, e Druga 2012; Higgins et al. 2010; Moreira et al. 2010; Nagley et al. 2010; Sims e Muyderman 2010).

Lo stress ossidativo è una alterazione dell'equilibrio tra la produzione di specie reattive di piccole molecole intracellulari (S. Wang et al. 2012) e il livello di antiossidanti endogeni.

L'ossigeno è fondamentale per le normali attività degli organismi eucarioti. Nelle cellule viventi entra circa il 2% di ossigeno che viene convertito in ROS e RNS tramite una cascata di

reazioni che consuma costantemente queste specie (figura 7) (Boveris, Oshino, e Chance 1972). Tuttavia, quando le cellule producono specie reattive a una velocità maggiore rispetto a quella che può essere consumata dai sistemi intracellulari, si verifica un'iperossia, che provoca neurotossicità (Ahdab-Barmada et al. 1986; Danilov e Fiskum 2008; Hinkelbein, Feldmann, e Kalenka 2010).

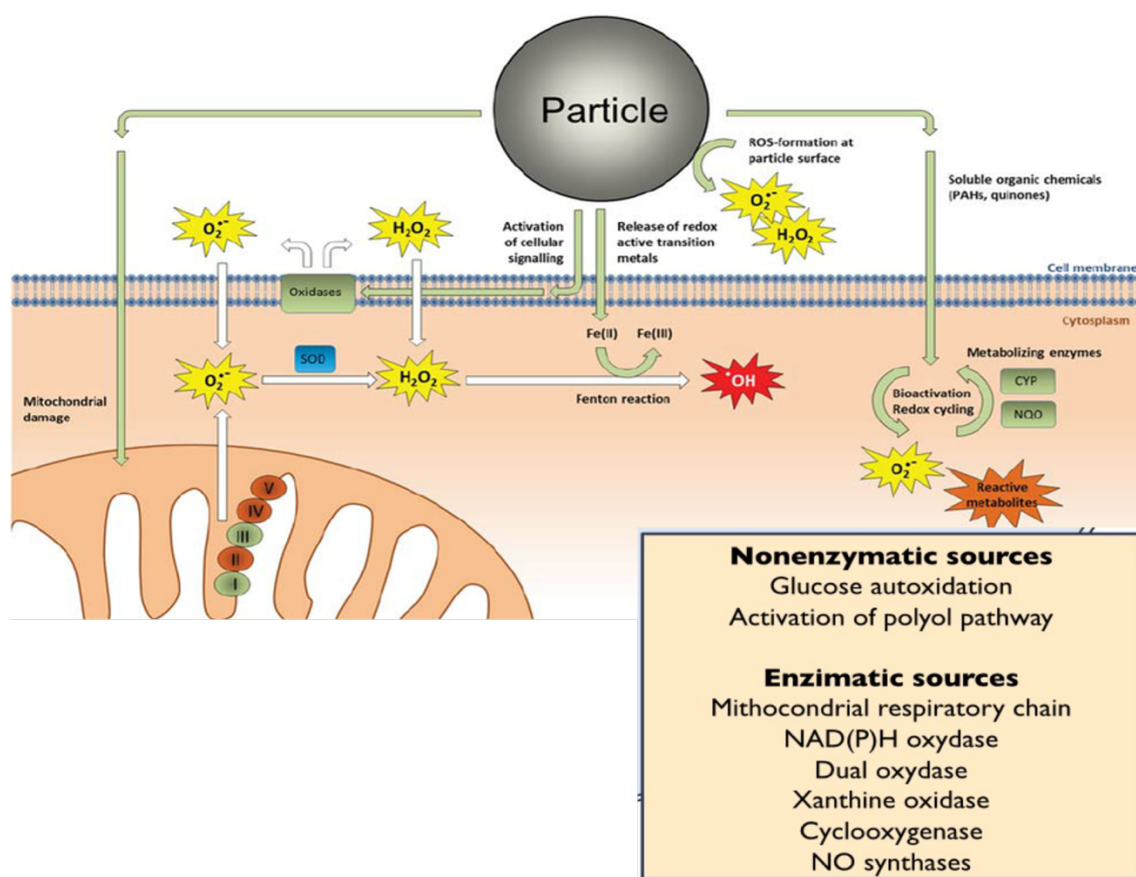


Figura 7. Reazioni a cascata per la formazione di ROS/RNS. Tratto e modificato da: Ovrevik et al. 2015.

La reattività chimica e la tossicità dell'ossigeno dipendono dalla sua struttura elettronica. L'ossigeno è una molecola normalmente stabile da un punto di vista cinetico, ma i due elettroni meno legati in O_2 occupano orbitali degeneri di simmetria π ed hanno spin parallelo: questi stati di spin in presenza di catalizzatori determinano un'instabilità tale da produrre forme parzialmente ridotte di ossigeno, principalmente ROS e RNS (figura 8) (Valko et al. 2007).

Reactive Oxygen Species (ROS)

Radicals:

$O_2^{\cdot-}$	Superoxide
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl
$RO_2^{\cdot}$	Peroxyl
$RO^{\cdot}$	Alkoxy
$HO_2^{\cdot}$	Hydroperoxyl

Non-Radicals:

H_2O_2	Hydrogen peroxide
$HOCl$	Hypochlorous acid
O_3	Ozone
$^1O_2$	Singlet oxygen
$ONOO^-$	Peroxynitrite

Reactive Nitrogen Species (RNS)

Radicals:

$NO^{\cdot}$	Nitric Oxide
$NO_2^{\cdot}$	Nitrogen dioxide

Non-Radicals:

$ONOO^-$	Peroxynitrite
$ROONO$	Alkyl peroxyntrites
N_2O_3	Dinitrogen trioxide
N_2O_4	Dinitrogen tetroxide
HNO_2	Nitrous acid
NO_2^+	Nitronium anion
NO^-	Nitroxyl anion
NO^+	Nitrosyl cation
NO_2Cl	Nitryl chloride

Figura 8. Formazione specie radicaliche ROS/RNS. Tratto da:

<https://www.slideserve.com/fox/reactive-oxygen-and-nitrogen-species>.

Durante lo stress ossidativo cellulare, le forme radicali di ROS o RNS captano gli elettroni dai lipidi, carboidrati, proteine o acidi nucleici, danneggiando così queste biomolecole essenziali. Ma gli organismi aerobici per difendere le cellule da questo danno causato da ROS o RNS hanno sviluppato dei meccanismi antiossidanti di tipo:

- Enzimatici (ad esempio superossido dismutasi [SOD], catalasi, perossidasi ed eme ossigenasi);
- Non enzimatici regolatori di ossidoriduzione (ad esempio glutathione e vitamina C) (Dröge 2002).

La tossicità ROS / RNS è un fattore patogeno primario non solo nei disturbi neurodegenerativi come AD, morbo di Parkinson (PD) e sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (Gandhi e Abramov 2012; Halliwell 2006; (Mhatre, Floyd, e Hensley 2004), ma anche in molte malattie cerebrali non neurodegenerative, ad esempio ictus cerebrale (Chen et al. 2011), epilessia (Aguiar et al.

2012; Shin et al. 2011) encefalopatia epatica (Skowrońska e Albrecht 2013) e disfunzione cerebrale relativo alla tossicità da metalli pesanti (Farina et al. 2013).

L'aumento delle concentrazioni di ROS nel cervello sembra non essere provocato da un maggior stress ossidativo, ma piuttosto da una riduzione significativa sia dei meccanismi di difesa che di riparazione antiossidante, provocando un accumulo del danno ossidativo (Aarsland et al. 2004).

Ad esempio, l'attività di SOD, catalasi, glutazione perossidasi e glutazione reduttasi è ridotta nelle regioni cerebrali dei pazienti con AD (Pappolla, Omar, e Robakis 1992.; Zemlan, Thienhaus, e Bosmann 1989). La quantità di glutazione è ridotta anche nella substantia nigra dei pazienti con PD (Pearce et al. 1997). Inoltre, lo stress ossidativo, che causa neurodegenerazione, provoca anche altri danni come il misfolding delle proteine.

2.2. Danno ossidativo e malattie conformazionali delle proteine

AD, PD, malattia di Huntington, SLA e atassia di Friedreich appartengono a una classe di malattie caratterizzate dall'accumulo di proteine mal ripiegate nel sistema nervoso centrale (Crunkhorn 2012; Tabner et al. 2001; Zerovnik 2010). Tra il 1906 e il 1910, Alois Alzheimer e Gaetano Perusini analizzarono le autopsie di quattro persone affette da una demenza all'epoca sconosciuta ed osservarono la presenza di placche dense al di fuori dei neuroni e grovigli di fibre all'interno delle cellule cerebrali (Macchi, Brahe, e Pomponi 1997). Successivamente si scoprì che le placche erano composte da peptidi beta amiloidi mentre i grovigli di fibre erano costituiti da proteine tau iperfosforilate. Quindi, inseguito a questa scoperta, questo disturbo venne indentificato con il nome di Alzheimer.

Altri esempi di placche e fibre includono l'alfa-sinucleina nella demenza da corpi di Lewy (van Ham et al. 2008) e l'huntingtina mutante nelle malattie di Huntington (Scherzinger et al. 1997).

In condizioni fisiologiche, le cellule utilizzano meccanismi come la risposta a proteine mal piegate (UPR) per bilanciare un accumulo di proteine dispiegate o mal ripiegate nel lume del reticolo endoplasmatico (ER) (Zhang e Kaufman 2006). Successivamente, la risposta cellulare per queste proteine ripiegate in modo errato può essere diversa a seconda del loro danneggiamento:

1. Se il danno è reversibile, la cellula cerca di rompere gli aggregati proteici anormali per facilitare il ripiegamento delle proteine in modo corretto;
2. Se il danno è irreversibile, la cellula fornisce le proteine mal ripiegate al proteasoma per permetterne un efficace riciclaggio (Zhang e Kaufman 2006).

Come è stato descritto precedentemente un ripiegamento anomalo nella conformazione delle proteine causa malattie neuronali. Quindi, la formazione di questi aggregati di proteine anormali intracellulari causa lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) che porta ad una disfunzione mitocondriale ed una conseguente eccessiva produzione di ROS e stress ossidativo. Le cellule, però, per combattere livelli elevati di ROS (e RNS) attivano per esempio la produzione di molecole dotate di azione antiossidante e anti-apoptotica (Calabrese et al. 2012).

Studi recenti (de la Monte e Tong 2014) hanno suggerito che la resistenza all'insulina e al fattore di crescita simile all'insulina (IGF) provoca, in una zona specifica del cervello, una cascata caratterizzata da un aumento dello stress ossidativo, neuroinfiammazione, ridotta sopravvivenza cellulare, disfunzione mitocondriale, disregolazione del metabolismo lipidico e stress del reticolo endoplasmatico. La cascata porta alla disfunzione neuronale e alla morte nell'AD.

In conclusione, sembrerebbe che le caratteristiche molecolari, biochimiche e degenerative dell'AD potrebbero corrispondere ad anomalie che si verificano anche nello spettro delle malattie sistemiche insulino-resistenti.

2.3. Bilirubina e neurotossicità

L'elevata concentrazione di UCB ha un effetto citotossico a livello plasmatico e tissutale sia nelle cellule neuronali che quelle non neuronali. Infatti, per esempio l'ittero neonatale è causato da un aumento di UCB a livello plasmatico con conseguente accumulo nel sistema nervoso centrale (SNC). Questo avviene per due motivi: il primo perché la degradazione degli eritrociti avviene molto rapidamente, provocando un aumento della produzione di bilirubina, il secondo perché il fegato è immaturo ed ha una bassa capacità di coniugazione e quindi di metabolizzazione. Questo determina per le prime due settimane di vita ad un aumento della concentrazione plasmatica di UCB fino a 200 μ M, mentre dopo circa un mese i valori plasmatici della UCB diventano simili a quelli nell'adulto (20 μ M), dato che il sistema biliare e gli enzimi diventano maturi.

L'ittero neonatale è frequente e transitorio, ma può aggravarsi per esempio se si verifica un'eccessiva emolisi, oppure un ritardo dello sviluppo degli enzimi epatici di seconda fase (nei pretermine), o se sono presenti delle anomalie genetiche (come nella sindrome di Crigler-Najjar di tipo I). Studi in vitro hanno dimostrato che la tossicità è causata dalla UCB plasmatica che non risulta legata all'albumina, perché tale concentrazione supera la capacità di legame dell'HSA. Quindi, la UCB tramite diffusione passiva penetra nel SNC: il deposito di quest'ultima è multifocale e gli effetti citotossici sono diversi a seconda delle cellule. Il kernittero, si verifica quando la bilirubina lega i gangli della base, questa patologia causa encefalopatia da bilirubina, che determina anomalie cognitive, sensoriali (specialmente uditive e visive) e motorie. I neonati sono maggiormente soggetti ai danni cerebrali a causa della bassa affinità di legame tra UCB e HSA e della barriera emato-encefalica (BEE) non ancora completamente formata.

L'UCB può causare neurotossicità su diversi livelli:

- Attraverso il trasportatore MRP1 localizzato a livello del plesso coroideo, dei neuroni ed astrociti, l'UCB viene trasportata dal SNC all'ambiente extracellulare;
- Attraverso le ligandine o altre proteine citosoliche che si legano all'UCB presente a livello del SNC;
- Attraverso il SNC che può metabolizzare l'UCB in metaboliti non tossici mediante ossidazione e/o coniugazione;
- L'UCB è in grado anche di interferire con l'attivazione dei fattori ossidanti/antiossidanti o con quelli apoptotici/pro-apoptotici.

L'effetto tossico causato dall'UCB a livello del SNC può essere ricondotto al mal funzionamento mitocondriale, che provoca il disaccoppiamento proteico nella fosforilazione ossidativa.

Inoltre, concentrazioni di UCB di 0,5 μ M possono portare in colture primarie cerebrali di cellule prosencefaliche embrionali di ratto a fenomeni di apoptosi legati ai recettori glutammatergici N-metil-D-aspartato (NMDA) (Grojean et al. 2000). Però, l'UCB possiede un'attività inibitoria nei confronti delle colture di astrociti corticali di ratto, che determinano il rilascio di glutammato nelle sinapsi (Silva et al. 1999).

Questa inibizione è dipendente dal pH, avviene tra il pH 7.4-8, ma non a pH 7, quindi questa attività sembra causata dalla forma mono anionica della UCB.

La bilirubina provoca apoptosi anche quando il rapporto molare UCB/HSA è minore di 1, determinando come risposta il rilascio del citocromo C mitocondriale perché si verifica una maggiore mobilità proteica e fluidica della membrana e quindi un accumulo a livello citosolico. Ciò determina una depolarizzazione della membrana mitocondriale, la proteina pro-apoptotica Bax trasloca nel mitocondrio ed attivazione la caspasi 3. Però il processo apoptotico può essere causato da un'interazione fisica tra il pigmento e la membrana mitocondriale, dato che l'acido ursodesossicolico, stabilizzante della membrana del mitocondrio, ne elimina le perturbazioni inibendo l'apoptosi causata da UCB in neuroni ed astrociti (Rodrigues, Solá, e Brites 2002).

2.4. Bilirubina e neuroprotezione

Come già introdotto precedentemente, è stato dimostrato da diversi studi che l'induzione di HO-1 attiva il meccanismo difensivo cellulare, esercitando un effetto neuroprotettivo. Tuttavia, una sovraespressione di HO-1 può determinare una sovrapproduzione di CO e Fe^{2+} , sottoprodotti tossici, che possono determinare stress ossidativo e danno mitocondriale (Schipper et al. 2019).

Come già detto, l'azione antiossidante della bilirubina può essere spiegata dal ciclo redox bilirubina-biliverdina (figura 9), dove la bilirubina viene ossidata nuovamente nel suo precursore biliverdina (BV) da ROS, per poi essere ridotta velocemente nuovamente a bilirubina dalla biliverdina reduttasi (Barañano et al. 2002). Questo ciclo permette di aumentare l'attività antiossidante della UCB senza aumentarne la contrazione intracellulare a livelli tossici.

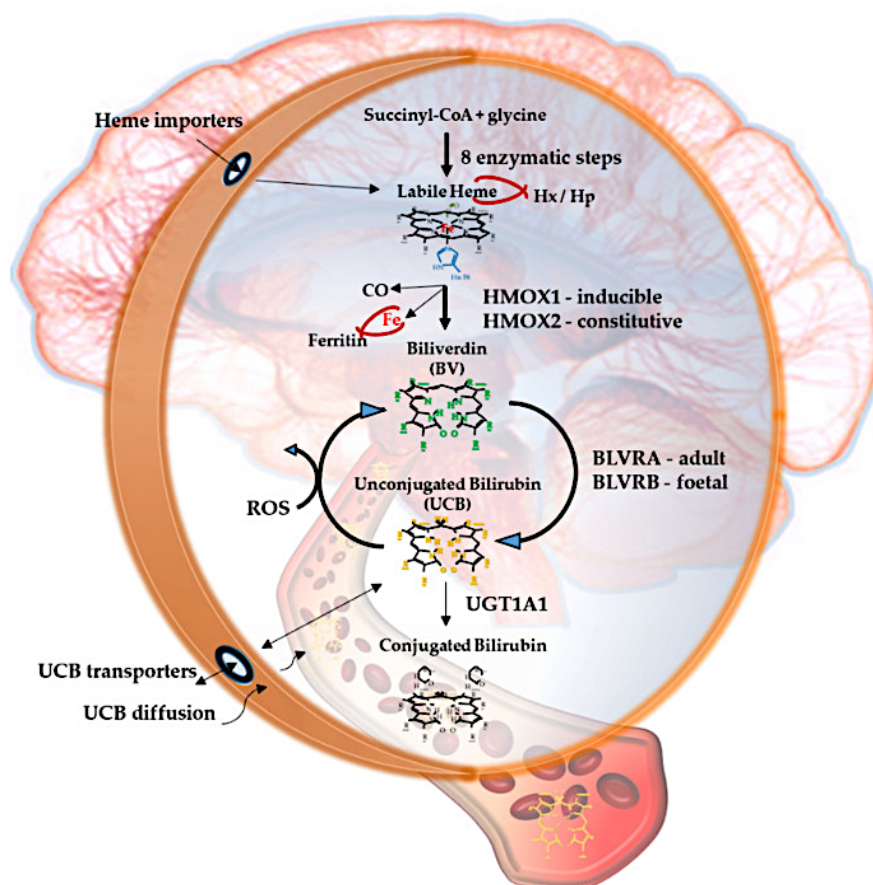


Figura 9. Schema riassuntivo dell'attività antiossidante della bilirubina. L'eme viene trasformata dall'eme ossigenasi (HMOX) in biliverdina (BV), ottenendo come sottoprodotti CO e Fe²⁺. La BV viene quindi convertito in bilirubina non coniugata (UCB) dall'enzima biliverdina riduttasi (BLVR), dove una parte viene riconvertita subito a BV da ROS. Nel fegato viene quindi coniugata dall'uridina difosfo-glucuronosil transferasi (UGT) 1A1 a bilirubina coniugata (CB), ed eliminato dall'organismo. Tratto da: Jayanti et al. 2020.

Inoltre, la bilirubina non elimina solo i ROS, ma è anche in grado di agire nei confronti delle specie reattive dell'azoto (RNS), inibendo così l'eccitotossicità del glutammato (Mancuso 2017). Numerosi studi clinici indicano che esiste una correlazione tra la concentrazione sierica di bilirubina e le condizioni neurologiche associate a radicali dell'ossigeno con una correlazione sia con la diagnosi che con la prognosi (Gazzin et al. 2016; Gazzin et al. 2017; Jayanti et al. 2020). Come recensito da Fujiwara et Al. (Fujiwara et al. 2018), anche nei neonati (Bin-Nun et al. 2018; Fereshtehnejad et al. 2012) è presente una stretta associazione tra la concentrazione di bilirubina plasmatica e la capacità antiossidante plasmatica (Fujiwara et al. 2018), infatti, si osservano neonati itterici che mostrano una capacità antiossidante plasmatica favorevole,

anche con una fototerapia sfavorevole (Aycicek e Erel 2007). Inoltre, è necessario ricordare che la tossicità della bilirubina dipende dal rapporto di concentrazione di UCB/albumina (Kapitulnik e Gonzalez 1993).

3. Antociani

Le antocianine sono antocianidine glicosilate, una sottoclasse di flavonoidi, presenti nel tessuto vegetale e caratterizzate da una serie di sfumature di colori intermedi agli estremi dello spettro visibile - rosso e violetto - e dipendenti dal pH del mezzo (figura 10) (Del Rio, Borges, e Crozier 2010; Kähkönen e Heinonen 2003; Mazza e Miniati 1993; Waterhouse 2002). Questi composti sono una delle famiglie più numerose di pigmenti idrosolubili nel regno vegetale. Dal 2013, gli antociani identificati in natura erano 702, ai quali si aggiungevano 200 strutture provvisorie (Ø. Andersen e Jordheim 2013).

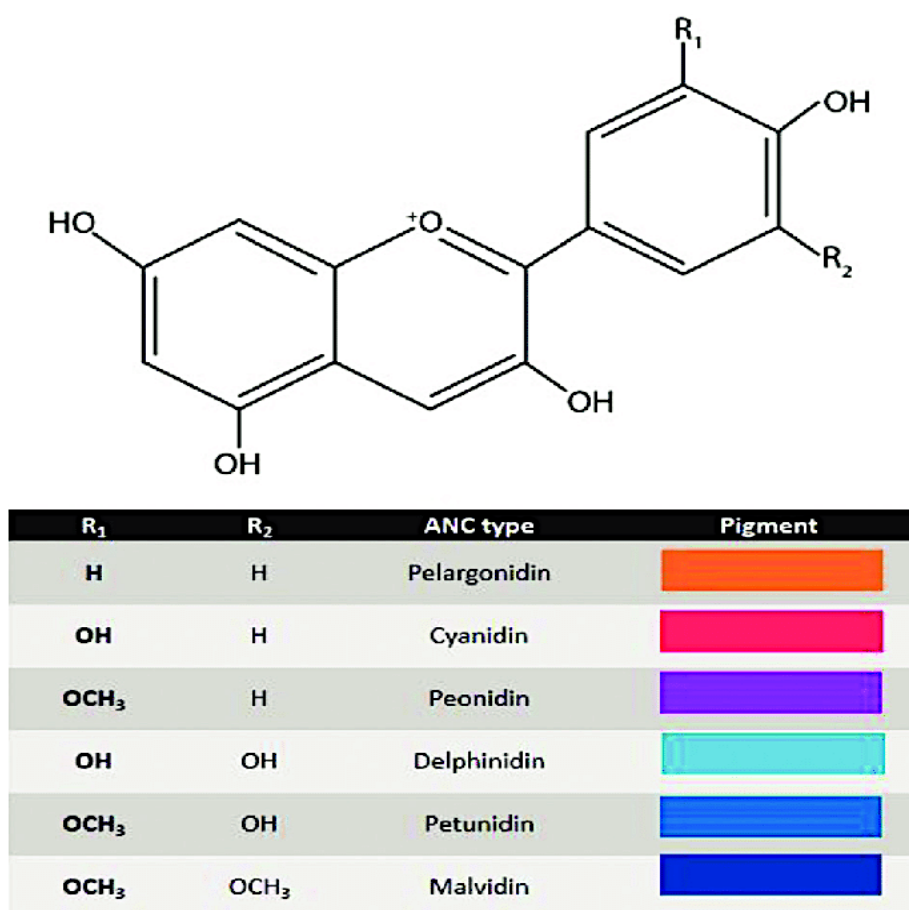
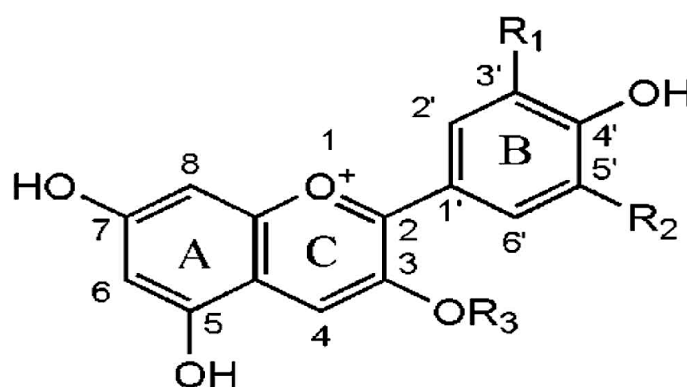


Figura 10. Principali antocianine e loro colorazione nel range del visibile. Tratto da: Ø. Andersen e Jordheim 2013.

Nelle parti commestibili delle piante si possono trovare sei antocianidine diverse che sono la cianidina (50%), pelargonidina (12%), peonidina (12%), delphinidina (12%), petunidina (7%) e malvidina (7%) (Kong et al. 2003) e sono classificati in base al numero e alla posizione di gruppi idrossile e metossile sul nucleo flavanico, cioè, a seconda dei gruppi chimici in R1 e R3 (figura 11).

Gli antociani sono costituiti da un aglicone (antocianidina, parte non zuccherina), uno zucchero e molto frequentemente vi è la presenza anche di un gruppo acile, per questo sono definiti come glicosidi idrosolubili di antocianidine. Gli antociani a pH acido sono carichi positivamente e questa specie è chiamata catione flavilium (2-fenilbenzopirilio). Sebbene in natura siano presenti circa 30 antocianidine diverse, il 90% di tutti gli antociani si basa sulle sei antocianidine descritte precedentemente e che differiscono solo per le idrossilazioni e metossilazioni presenti sull'anello B (figura 11).



Name	R ₁	R ₂
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OH	OCH ₃
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Cyanidin	OH	H
Peonidin	OCH ₃	H
Pelargonidin	H	H

R₃ = Glucose, galactose or arabinose

Figura 11. Strutture delle antocianidine più comuni. Tratto e modificato da: Teng et al. 2020.

Il principale glicoside è il 3-glicoside, ma se è presente un secondo zucchero, questo nella maggior parte dei casi è un residuo glicosilico nella posizione 5-idrossile. Tali composti sono chiamati 3,5-dimonosidi. Lo zucchero più comune è il glucosio (90%), seguito da ramnosio, galattosio, xilosio e arabinosio (Ø. M. Andersen e Markham 2006). Inoltre, il 65% degli antociani presenti in natura posseggono un gruppo acile, che può essere presente anche nell'unità zuccherina. Gli antociani possono essere acilati mediante gruppi acilici aromatico o alifatici o entrambi: i primi comprendono vari acidi idrossicinnamici (p-cumarico, caffeico, ferulico, sinapico e 3,5-diidrossicinnamico acidi) e due acidi idrossibenzoici (acidi p-idrossibenzoico e gallico); i secondi comprendono l'acido malonico (che è il gruppo acilico alifatico più frequente) e acetico, acido malico, succinico, tartarico e ossalico (Ø. M. Andersen e Markham 2006). La cianidina-3-O-β-glucoside (C3G) è la principale antocianidina presente nei cibi, il cui contenuto è proporzionale all'intensità del colore ed alla maturazione del frutto, raggiungendo valori fino a 2-4 g/kg di peso nel ribes e nelle more.

Gli antociani sono presenti soprattutto nella buccia, anche se in alcuni tipi di frutta rossa sono presenti nella polpa (ciliegie e fragole). Il vino, per esempio, contiene circa 200-350 mg di antociani/L, che possono trasformarsi in strutture più complesse man mano che il vino invecchia.

La cianidina-3-O-β-glucoside (C3G), inoltre, è diventata importante grazie alla sua attività neuroprotettiva, infatti, il consumo cronico di antociani è inversamente proporzionale al declino cognitivo associato all'età e alla neurodegenerazione (Gao et al. 2012; Krikorian et al. 2012). Altri effetti benefici del C3G sono: protezione contro la tossicità indotta dal beta peptide amiloide (Tarozzi et al. 2007; 2010), attività antiossidante (Im et al. 2013; Shih et al. 2010) e attività anti-ischemica e antinfiammatoria (Di Giacomo et al. 2012; Kang et al. 2006).

Un altro meccanismo di neuroprotezione del C3G si basa sulla sua capacità di aumentare il flusso sanguigno cerebrale e quindi avviare la neurogenesi nell'ippocampo (Williams e Spencer 2012). Recenti studi in vitro hanno suggerito che l'incubazione con C3G a breve termine (circa 20 minuti) può attivare le vie di segnalazione correlate a neuroprotezione, ad esempio protezione contro l'apoptosi neuronale indotta da etanolo a livello dei neuroni dell'ippocampo (ali Shah et al. 2013). È importante sottolineare però che il C3G si accumula all'interno delle cellule endoteliali del cervello (Milbury e Kalt 2010) e che attraversa la barriera emato-encefalica in modo dipendente dal tempo, in 1 ora (Faria et al. 2010).

Da un punto di vista farmacologica gli antociani presentano una limitata biodisponibilità, che determina concentrazioni plasmatiche molto basse (0,1-1 μM) (Manach et al. 2005) e questo è causato dal loro scarso assorbimento nel sistema circolatorio e nell'intestino tenue e dal loro ampio assorbimento negli organi escretori (Vanzo et al. 2011), seguito da un metabolismo veloce ed esteso.

Sono stati eseguiti recenti studi sull'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione (ADME), mediante volontari che hanno ingerito 0.5 g (1114 μmol) di C3G marcata isotopicamente (6,8,10,3',5' - (13) C5-C3G). Dopo 48 ore, la biodisponibilità relativa al C3G era il 12% della dose, con il 5.4% escreto nelle urine, il 6.9% dalla respirazione ed il 32% escreto nelle feci. Questi dati suggeriscono una maggiore biodisponibilità rispetto a quella considerata precedentemente (Czank et al. 2013). La concentrazione dei metaboliti degli antociani circolanti è pari a 11 nmol / L per 4-acido idrossibenzoico-3-O-glucuronide (acido protocatechuico-3-O-glucuronide) e 1962 nmol / L per l'acido ippurico (de Ferrars et al. 2014). Ma l'accumulo dei metaboliti potrebbe essere responsabile della bioattività degli antociani; infatti, la microflora sembrerebbe che svolga ruolo molto importante nel processo di biotrasformazione.

Gli antociani si distribuiscono ampiamente a livello corporeo, infatti sono molto presenti anche a livello periferico. In particolare, è stato osservato che nei suini alimentati con una dieta integrata con mirtilli per 4 settimane si localizzano principalmente a livello della corteccia e del cervelletto (Kalt et al. 2008). Uno studio simile, in cui la somministrazione orale avveniva nei ratti ha confermato la presenza di pelargonidina nel cervello (El Mohsen et al. 2006). Inoltre, un esperimento sempre su ratti, ai quali è stato legato lo stomaco ha evidenziato che gli antociani erano presenti nel tessuto cerebrale anche dopo una breve incubazione di 10 minuti nello stomaco (Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005a). Nonostante siano ancora da chiarire i meccanismi con cui le antocianine si accumulano a livello del sistema nervoso centrale, si può affermare, dato che è stato più volte dimostrata la loro presenza in questo particolare tessuto.

Inoltre, solo di recente è stata notata la somiglianza di questi composti con le ftaleine. Con estremo interesse quindi, si è iniziato a pensare alle antocianine come possibili substrati della bilitraslocasi. Per verificare questa opzione, sono stati selezionati degli agliconi, dei monoglucosidi e dei diglucosidi per testarli come inibitori dell'attività di trasporto in vitro ed è stato confermato che molti di essi reagiscono come inibitori competitivi e presentano una K_i

tra i 2-20 μ M. I mono e diglucosidi si sono dimostrati i ligandi migliori, si è ipotizzato dunque che fosse proprio l'anello piranosinico ad avere un ruolo importante nel legame. Infatti, minime variazioni dell'anello piranosinico in posizione C4 o C5 determina il passaggio da un'inibizione competitiva ad una non competitiva a causa della diversa interazione con il sito. Solamente un composto, probabilmente per motivi di ingombro sterico, non interagisce con il trasportatore: l'estere para-cumarico della malvidina 3-O-glucoside. Sulla base delle relazioni tra struttura e attività dimostrate da questi composti, si fecero delle ipotesi riguardo all'orientamento delle molecole nel sito del trasportatore. I dati sono compatibili con le seguenti osservazioni: i monoglucosidi espongono al sito una porzione 3-O-glicosilica e l'anello B; i diglucosidi espongono al sito la porzione 5-O-glicosilica e l'anello A, gli agliconi espongono al sito a volte l'anello A, a volte l'anello B (S Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002).

In base a questi dati, è stato possibile sviluppare un modello meccanicistico che spiegasse gli effetti competitivi e non competitivi degli inibitori dell'attività di trasporto della bilitraslocasi. Gli inibitori competitivi agiscono, durante il ciclo di trasporto, andando a competere con la sulfobromoftaleina nel processo di traslocazione e modificandone l'affinità per il trasportatore, si può dedurre perciò che essi possono essere trasportati a loro volta. Gli inibitori non competitivi presentano una sostanziale differenza nel tipo d'interazione con il trasportatore che, sebbene reversibile, interessa comunque un sito diverso da quello di trasporto. A volte, il meccanismo d'azione dell'inibitore non competitivo sfrutta semplicemente la posizione del suo sito che può essere così vicina al sito di trasporto, da disturbare la velocità di traslocazione del substrato, ma mai la sua affinità. Nel caso in cui si verificasse un trasporto d'inibitori non competitivi, si dovrebbe osservare un'inibizione di tipo misto.

3.1. Biodisponibilità e problemi farmacocinetici

La bassa tossicità apparente e l'alta bioattività dei flavonoidi li rende molto adatti ad essere utilizzati come medicinali. Inoltre, altre caratteristiche dei flavonoidi sono basse concentrazioni plasmatiche dovute al loro scarso assorbimento e ampio assorbimento cellulare negli organi escretori (Vanzo et al. 2011) seguito dal metabolismo.

La bassa concentrazione plasmatica dei flavonoidi è causata dal legame di quest'ultimi con l'albumina sierica, che riduce la concentrazione plasmatica di flavonoidi bioattivi non legati, permettendo quindi di conservarli per poterli rilasciare nel plasma successivamente quando

sono necessari (Dufour e Dangles 2005). Inoltre, i flavonoidi legati all'albumina sembrerebbero più stabili nei confronti della degradazione dovuta all'ossigeno, prolungando così sia la loro biodisponibilità che la loro emivita plasmatica (Kitson 2004). Il legame dei flavonoidi con l'albumina sierica permette di proteggere da un assorbimento transitorio e acuto i tessuti bersaglio, nei quali si potrebbe innescare una reazione tossica delle cellule. Infatti, il rilascio prolungato di flavonoidi dalle proteine plasmatiche ne causerebbe un elevato e costante assorbimento cellulare.

Tuttavia, una bassa biodisponibilità non deve essere correlata a una bassa bioattività. Studi recenti hanno dimostrato che anche i metaboliti dei flavonoidi possono possedere la stessa farmacodinamica del composto originario (Terao, Murota, e Kawai 2011). Inoltre, i flavonoidi e i suoi metaboliti potrebbero avere effetti opposti, additivi o sinergici, che potrebbero modificare la bioattività complessiva. Per esempio, l'attività antiproliferativa nelle cellule muscolari lisce vascolari di quattro polifenoli del vino rosso: i.e.resveratrolo, quercetina, etil gallato e (+) – catechina era maggiore rispetto all'attività di ogni singola sostanza (Kurin et al. 2012). Inoltre, anche in uno studio contro il cancro, la presenza sinergica di due flavonoidi, diosmetina e luteolina, determinava un effetto citostatici maggiore rispetto a quello del singolo composto (Androutsopoulos e Spandidos 2013).

La sinergia nella farmacodinamica è stata osservata anche nell'uso combinato tra flavonoidi e farmaci: ad esempio l'azione antivirale dell'aciclovir è stata potenziata dal 4'-fenilflavone (Hayashi et al. 2012). Tutti questi esempi suggeriscono che anche se i flavonoidi alimentari sono presenti a basse concentrazioni plasmatiche (range nM), determinano comunque benefici per la salute umana.

Si deve considerare però, sia nei saggi cellulari in vitro che negli studi in situ sugli organi isolati, non solo l'attività di ogni singola molecola ma anche quella di miscele di molecole (estratto vegetale) e soprattutto di tutti i loro metaboliti nel loro intervallo di concentrazione fisiologico (nM- μ M).

Un altro importante fenomeno farmacologico legato alla bassa biodisponibilità, ma alta bioattività dei flavonoidi è l'ormesi: essa è una relazione dose-risposta causata da un effetto bifasico, ovvero modesta stimolazione della funzione interessata a basse dosi ed inibizione della stessa alle alte dosi, o viceversa. La risposta ormetica può essere causata da fenomeni di compensazione, dovuti all'alterazione dell'omeostasi (OCSH, Over Compensation Stimulation

Hormesis), oppure può essere dovuta da un effetto diretto (DSH, Direct Stimulation Hormesis) (Calabrese et al. 2012).

Per esempio, effetti benefici contro il cancro della quercetina vengono osservati a basse concentrazioni (1-40 μM) e sono probabilmente causati dalle proprietà antiossidanti della quercetina, mentre a concentrazioni di 40-100 μM si verificano effetti citotossici e pro-ossidanti (Vargas e Burd 2010).

I flavonoidi, quindi sono molecole tossiche quando raggiungono livelli sub-tossici nel corpo umano, inducendo lievi risposte allo stress cellulare, che portano all'attivazione di varie chinasi e fattori di trascrizione che inducono l'espressione di geni e che codificano per: enzimi antiossidanti (chaperoni proteici), enzimi metabolici di fase II, fattori neurotrofici e altri citoprotettori (Son, Camandola, e Mattson 2008).

Invece, a basse concentrazioni (nel range fisiologico), i flavonoidi agiscono sull'espressione dei geni coinvolti nell'invecchiamento vascolare. Ad esempio, sono state trattate cellule endoteliali (HUVEC) con acido ferulico, quercetina o resveratrolo con concentrazione 0,1 μM , determinando la sotto-regolazione (> 2 volte) di 363 geni e la sovraregolazione (> 2 volte) di 233 geni, su 10.000 geni analizzati (Nicholson, Tucker, e Brameld 2008). Inoltre, i composti utilizzati hanno aumentato l'espressione del gene che codifica per NO sintasi (eNOS), mentre hanno ridotto l'espressione del potente vasocostrittore endotelina-1 (Nicholson, Tucker, e Brameld 2008). Saranno necessari, quindi, ulteriori studi per identificare anche i bersagli cellulari dei flavonoidi che determinano citoprotezione in vivo (Mastaloudis e Wood 2012), e non solo quelli che hanno attività antiossidante in vitro. Ad esempio, l'epigallocatechina gallato (EGCG), attiva la via di segnalazione di Akt e ERK1 / 2, che regola l'espressione dell'eme ossigenasi-1 nell'endotelio cellulare (Wu et al. 2006), che porta ad un effetto protettivo contro lo stress ossidativo (Wu et al. 2006).

Tuttavia, la ricerca futura deve ancora chiarire se l'attivazione delle vie di segnalazione avviene perché i flavonoidi si legano ai recettori della membrana cellulare o perché si legano a recettori intracellulari in seguito al trasporto trans-membrana.

3.2. Proprietà antiossidanti degli antociani

Si definisce antiossidante qualsiasi sostanza a bassa concentrazione rispetto ad un substrato ossidabile, che sia in grado di ritardare o impedire notevolmente l'ossidazione di quel substrato (Halliwell 1999). Si pensa che gli antiossidanti agiscano contro la neurodegenerazione, limitando la produzione di sostanze tossiche e riducendo i danni dei radicali liberi (Mao 2013). È noto che sono presenti meno enzimi antiossidanti specifici per i neuroni, suggerendo quindi che siano i nutrienti antiossidanti che hanno un ruolo fondamentale nell'invecchiamento del cervello rispetto a quello di altri organi (Olanow et al. 1990).

Tuttavia, risultano ancora pochi gli studi clinici condotti sugli antociani come integratori alimentari o su nuove forme di dosaggio dell'estratto di vino rosso (Albarracin et al. 2012).

Gli effetti benefici di questi composti sono stati tradizionalmente attribuiti alla loro capacità antiossidante nei confronti dei radicali degli anioni superossido e dei radicali idrossilici e perossidici (Nijveldt et al. 2001; Robak e Gryglewski 1988). Inoltre, l'azione protettiva degli antociani come antiossidante intracellulare si raggiunge a concentrazioni molto basse ($<1\mu\text{g/l}$; range nM), nonostante le loro proprietà farmacocinetiche siano sfavorevoli (Bornsek et al. 2012).

Nell'attività antiossidante degli antociani, infatti, sono fondamentali i gruppi OH delle posizioni 3 e 4' (figura 12) che spengono le specie reattive radicaliche mediante la reazione di trasferimento di un singolo elettrone e attraverso l'eliminazione di un atomo di idrogeno dai gruppi fenolici (Mattioli et al. 2020). In particolare, i gruppi catecolo (3 gruppi' e 4' diidrossifenile) sull'anello B, tramite due reazioni consecutive che coinvolgono il trasferimento di un elettrone, determinano la formazione prima di orto-semichinoni e successivamente orto-chinoni (Nimse e Pal 2015; Kähkönen e Heinonen 2003; Duchowicz, Szewczuk, e Pomilio 2019).

La cianidina presentando altri gruppi ossidrilici negli anelli A e C che possono dar luogo ad ulteriori centri di eliminazione di ossidanti e di delocalizzazioni radicaliche, formando specie pseudo-semichinoniche (posizione 3, 5 e 7). Queste specie possono essere ulteriormente ossidate per dare origine a strutture pseudochinoniche 3,5 o 3,7, che possono successivamente isomerizzare tramite tautomeria cheto-enolica (Nimse e Pal 2015; Ali, Almagribi, e Al-Rashidi 2016; Duchowicz, Szewczuk, e Pomilio 2019).

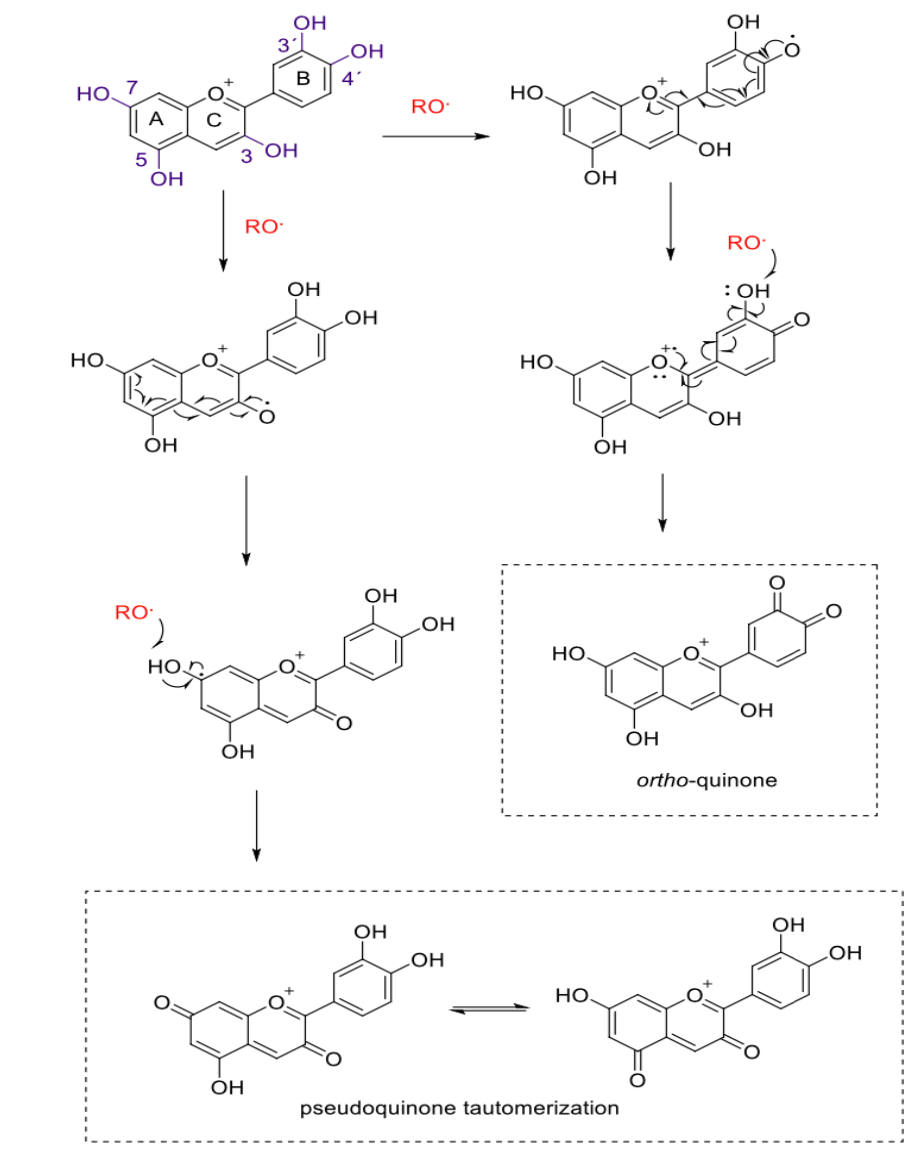


Figura 12. Rappresentazione schematica dell'azione antiossidante della cianidina nei confronti di un ossidante radicale generico ($RO^\bullet$): per le posizioni 3 (sinistra) e 4 (destra) vengono mostrate anche la rispettiva delocalizzazione elettronica e le strutture di risonanza.

Tratto da: Mattioli et al. 2020.

3.3. Antociani e salute

Numerosi studi epidemiologici hanno confermato che una dieta ricca di polifenoli, ed in particolare di antociani, riduce il rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari, neoplasie e di disordini neurodegenerativi (Augustin Scalbert et al. 2005), suggerendo che gli effetti benefici degli antociani siano dovuti principalmente alla capacità di combattere lo stress ossidativo provocato da queste patologie (Hollman e Katan 1999b).

Il loro potere antiossidante dipende da diversi fattori: dal numero di anelli fenolici, dal numero e dalla posizione di gruppi idrossilici e di doppi legami presenti nella molecola, ed è determinato, in particolare, dalla presenza di un anello- B diidrossilato (gruppo catecolico), di un doppio legame in posizione 2,3 associato ad una funzione 4-carbonilica nell'anello C e di gruppi funzionali capaci di chelare i metalli di transizione (Bors, Michel, e Stettmaier 2001).

Differenti studi hanno mostrato che esiste una correlazione inversamente proporzionale tra consumo di flavonoidi alimentari (tra cui gli antociani) e declino cognitivo dipendente dall'età e dal tipo di demenza, inclusi AD e PD (Commenges et al. 2000; Rijk et al. 1997). Infatti, sembrerebbe che gli antociani introdotti con la dieta possiedono proprietà benefiche utili per la memoria umana grazie alla loro capacità di proteggere i neuroni vulnerabili, migliorare e stimolare la rigenerazione neuronale (Gutierrez-Merino et al. 2011; Spencer 2009). Un altro studio clinico, invece, ha dimostrato che integrando l'alimentazione con il succo d'uva per dodici settimane si possono avere effetti benefici di tipo neurocognitivo negli anziani, che presentano un deficit precoce della memoria (Krikorian et al. 2010), ma anche migliorare le funzioni memoniche degli anziani, che presentano un deficit lieve della memoria (Krikorian et al. 2012). Inoltre, è stato dimostrato che gli antociani agiscono nei complessi meccanismi legati alle malattie neurodegenerative in diversi tipi di colture cellulari e modelli animali (Basli et al. 2012; Dajas et al. 2003; Echeverry et al. 2010; J. T. T. Zhu et al. 2007), suggerendo che una dieta ricca di antociani possa migliorare la qualità della vita e prevenire malattie ancora poco conosciute.

4. Metabolismo epatico della bilirubina

All'interno degli epatociti la bilirubina subisce un effetto di primo passaggio trascurabile, invece risulta essere importante la glucuronazione, essa avviene nel reticolo endoplasmatico grazie alla uridina-difosfato glucuronosiltransferasi 1A1 (UGT1A1). Questa superfamiglia di enzimi è localizzata a livello del reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, nell'apparato del Golgi e nella membrana nucleare, inoltre l'isoforma epatica principale è la UGT1A1 (11%).

La reazione avviene in diversi steps: l'acido glucoronico si lega all'UDP e viene attivato, successivamente si forma un legame estereo tra lo zucchero ed uno dei gruppi carbossilici della bilirubina, per dare un monoglucuronide oppure se il legame è tra lo zucchero e due gruppi carbossilici si formerà un diglucuronide. La principale proprietà della bilirubina coniugata (CB) è l'idrosolubilità determinata sia dalla rottura dei legami idrogeno intramolecolari, che

permette di rendere disponibili i gruppi polari dell'UCB, sia perché l'acido glucuronico possiede dei gruppi carbossilici ed ossidrilici.

L'80% della bilirubina coniugata nell'adulto è diglucuronata (BDG), mentre nel neonato prevale la forma monoglucuronata (BMG). L'enzima può anche trasformare BMG in BDG ed il rapporto fisiologico della mono/diglucuronide nella bile è pari a 0.37 (D. G. Levitt e Levitt 2014).

La velocità di glucuronazione è direttamente proporzionale alla concentrazione della bilirubina libera e questo risulta essere lo step cineticamente limitante per il passaggio della bilirubina dal plasma alla bile. Lo step che influisce sulla concentrazione di bilirubina sistemica è la reazione di coniugazione: l'enzima UGT1A1 causa il 45% delle variazioni della bilirubina. L'enzima UGT1A1 ha un'elevata affinità per la bilirubina, per questo è noto che solo l'indinavir e l'ibuprofene possono essere considerati xenobiotici capaci di avere un'inibizione di tipo competitiva nei confronti dell'enzima. Inoltre, uno studio recente ha dimostrato che anche alcuni ormoni tiroidei come tiroxina e triiodotironina possano avere un'attività di tipo inibitorio, questo perché nei pazienti con sindrome metabolica, ovvero con bassi livelli di ormoni tiroidei, si verifica una diminuzione della concentrazione di bilirubina (Wagner et al. 2018).

La coniugazione della UCB avviene grazie alla biodisponibilità dell'acido glucuronico associato all'UDP (UDPGA): quest'ultimo dal citosol giunge alla membrana interna del reticolo endoplasmatico dove è localizzato l'UGT1A1; tuttavia, durante il periodo neonatale viene ridotto da molti farmaci.

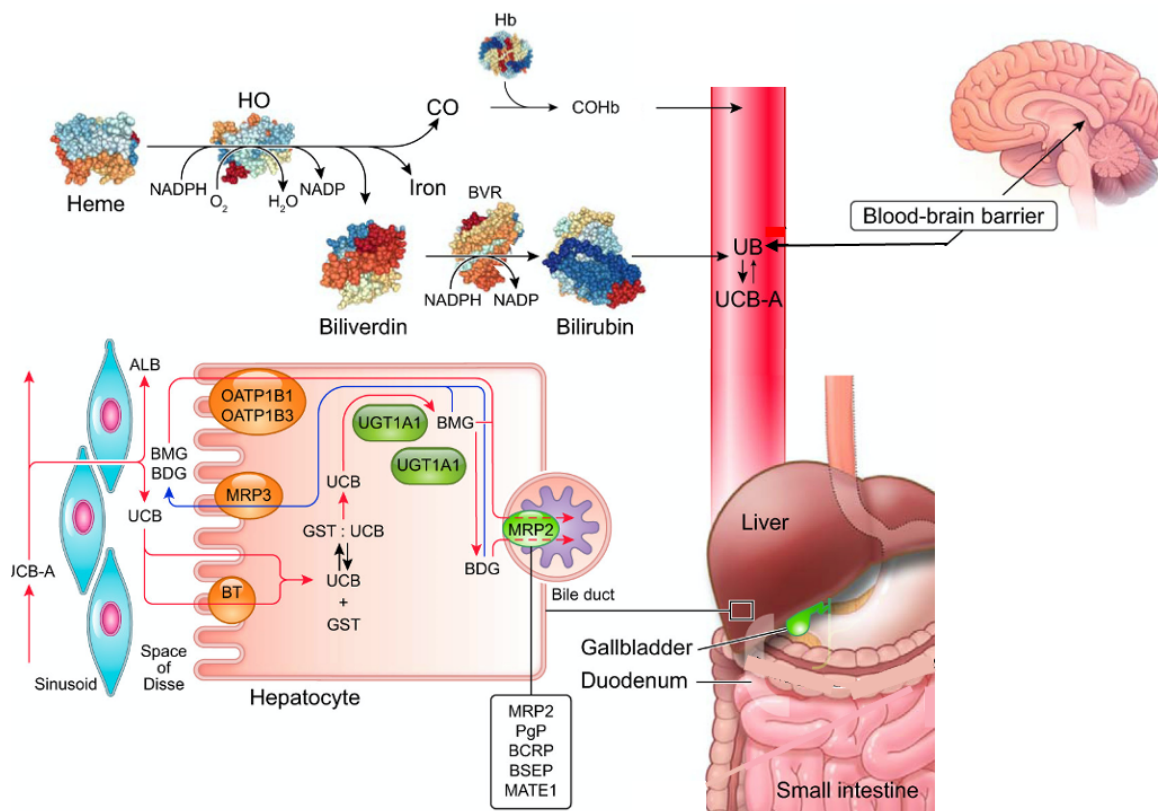


Figura 13. Il trasporto di bilirubina alla cellula epatica e il suo metabolismo. Tratto e modificato da: Hansen, Wong, e Stevenson 2020.

Dopo che si è formata la bilirubina coniugata a livello dell'epatocita, essa viene riversata prima nella bile e poi nell'intestino per essere eliminata. Nonostante questo, uno studio condotto su animali con attività della UGT1A1 diminuita, ha dimostrato che la bilirubina subisce un trasporto di tipo transepiteliale per raggiungere l'intestino (Wagner et al. 2018).

La principale via di eliminazione della bilirubina è la via biliare, dove viene coniugata ed escreta nei canalicoli biliari (figura 13). La secrezione canalicolare avviene grazie alla pompa $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ espressa nella membrana basolaterale dell'epatocita, che determina un potenziale negativo intracellulare. L'escrezione della CB nella bile avviene principalmente grazie alla multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) ed in misura minore alla ATP-binding cassette G2 (ABCG2).

La MRP2, anche chiamata ATP-binding cassette C2 (ABCC2), è espressa in condizioni fisiologiche nella parte apicale (canalicolare) degli epatociti, nei reni, duodeno, ileo, cervello e placenta. Questo trasportatore ha una costante di dissociazione (K_d) pari a $0,7\mu\text{M}$ per la BMG e $0,9\mu\text{M}$ per la BDG (D. G. Levitt e Levitt 2014). Il meccanismo d'azione è un trasporto ATP-

dipendente, perciò la sua attività può venir meno in casi di ipossia, shock o stasi circolatoria. Infatti, il ruolo fondamentale della proteina MRP2 è osservabile nei pazienti affetti da sindrome di Dubin-Johnson: tale patologia è causata da una mutazione del gene codificante MRP2 che provoca un aumento fino a dieci volte della concentrazione plasmatica della bilirubina totale (la concentrazione di UCB aumenta fino a 4 volte mentre quella di CB fino a 200 volte).

A livello intracellulare nell'epatocita la ligandina (K_d pari a $3\mu M$) legherà la CB, che poi verrà trasferita alla membrana basolaterale, mediante un meccanismo non ancora completamente noto.

In questa fase sembra coinvolta la radixina, una proteina citoscheletrica che partecipa attivamente all'ancoraggio della MRP2 alla membrana canalicolare (Kikuchi et al. 2002).

La secrezione di CB nella bile diminuisce se la MRP2 canalicolare (apicale) non risulta più funzionale; infatti, si verifica l'upregulation dell'omologo basolaterale della MRP2 che trasporta la bilirubina coniugata nel sangue sinusoidale.

Studi recenti hanno evidenziato che in condizioni fisiologiche la bilirubina diretta viene secreta prima nel sinusoidale epatico, poi viene ricaptata dall'epatocita ed infine viene eliminata tramite la via biliare, come raffigurato nella figura 14.

La CB tramite il trasportatore MRP3 viene riversato nel sangue sinusoidale, per poi essere ricaptata dai polipeptidi trasportatori di anioni organici (OATP) 1B1 e 1B3. Questi polipeptidi sono localizzati soprattutto a livello degli epatociti centrolobulari e permettono il trasporto facilitato di numerosi substrati endogeni ed esogeni.

Tale processo, definito "hopping", permette di spostare la CB dalla zona periportale alla centrolobulare del fegato per proteggere gli epatociti periportali dagli xenobiotici che possono raggiungere elevate concentrazioni (Sticova e Jirsa 2013).

Le proteine OATP epatiche presentano un meccanismo di trasporto ancora poco conosciuto. Nel 2012 è stato effettuato uno studio con topi knockout per OATP1A e OATP1B, in cui è aumentata di circa 400 volte la CB sierica ed è dimezzata la velocità di secrezione della bilirubina nella bile causando un aumento della eliminazione per via urinaria (Iusuf, van de Steeg, e Schinkel 2012).

Inoltre, le proteine OATP1B sembrerebbero avere un ruolo fondamentale nella captazione epatica della UCB. Infatti, nella sindrome di Rotor (malattia epatica benigna ereditaria caratterizzata da iperbilirubinemia coniugata) non vi è la presenza di questa proteina per cui vi sono elevati livelli di UCB ed inoltre i livelli di bilirubina sierica sono influenzati dal polimorfismo a carico del gene codificante tali trasportatori. Si ipotizza, invece, che OATP1B3 capti, a livello dei trofoblasti placentari, l'UCB fetale, che poi viene eliminata attraverso la barriera placentare (Briz et al. 2003).

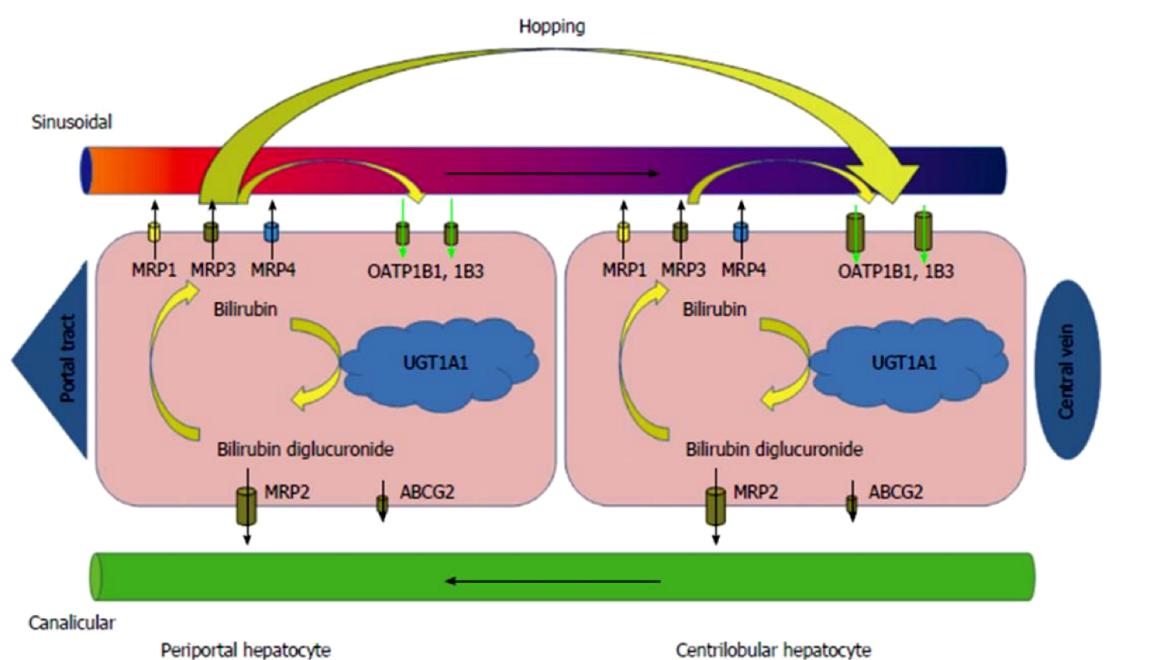


Figura 14. Ciclo epatico della coniugazione della bilirubina. Tratto da: Sticova 2013.

Dal catabolismo dell'eme alla secrezione della CB nella bile, la bilirubina impiega circa 1-2 minuti e lo step cineticamente limitante è l'escrezione della CB.

A livello dei canalicoli biliari, la CB si lega alle micelle miste, che si sono formate a partire dai sali biliari che reagiscono con i prodotti della digestione lipidica. Successivamente la CB tramite la via biliare principale (dotto biliare, dotto epatico e coledoco), raggiunge la cistifellea, dove in condizioni fisiologiche si accumula ad una concentrazione di 500µM. Meno dell'1% della bilirubina nella bile in condizioni fisiologiche si trova in forma indiretta, tuttavia ciò può essere dovuto ad una deconiugazione spontanea a causa dell'incubazione a 37°C (D. G. Levitt e Levitt 2014).

Al termine dei pasti, la CB, che è assorbita poco nel piccolo intestino, diventa substrato per le β -glucuronidasi batteriche presenti nell'ileo terminale e nel colon. A questo livello quindi si forma la UCB, che può essere riassorbita per diffusione passiva. In questa fase il digiuno, per esempio, può rallentare la motilità ed aumentare il tempo di transito gastrointestinale e quindi di conseguenza raddoppiare la concentrazione di bilirubina circolante. Inoltre, nei soggetti affetti dalla sindrome di Gilbert è stato osservato un ritardo del tempo di svuotamento gastrico, suggerendo che la concentrazione della bilirubina influenzi la motilità gastrica e viceversa (Wagner et al. 2018).

Successivamente la bilirubina non coniugata tramite una serie di reazioni di riduzione causate dalla flora batterica dell'ileo distale e del colon, viene convertita in un gruppo di tetrapirroli incolore chiamati bilinogeni fecali e composti da mesobilirubina, urobilinogeno e stercobilinogeno, come visibile nella figura 15. In dettaglio, il primo step della reazione prevede la conversione, mediante riduzione, della bilirubina in mesobilirubina ($+2H_2$), la quale subisce un'altra riduzione per diventare urobilinogeno ($+2H_2$) ed infine viene ulteriormente ridotto a stercobilinogeno ($+2H_2$). Per quanto riguarda gli specifici ceppi batterici coinvolti ed il meccanismo biochimico si possiedono ancora poche conoscenze: ma si pensa che le prime due riduzioni (da bilirubina a mesobilirubina con la formazione di diidrobilirubina come intermedio) si verificano a livello delle catene viniliche sugli anelli A e D, mentre la riduzione a urobilinogeno, con la formazione di diidromesobilirubina come intermedio, si verifica a livello dei ponti metilenici sul C4 e sul C15, ed infine la riduzione a stercobilinogeno, avente come intermedio il semistercobilinogeno, avviene a livello delle insaturazioni in posizione β nei due anelli pirrolici A e D (Vitek e Ostrow 2009).

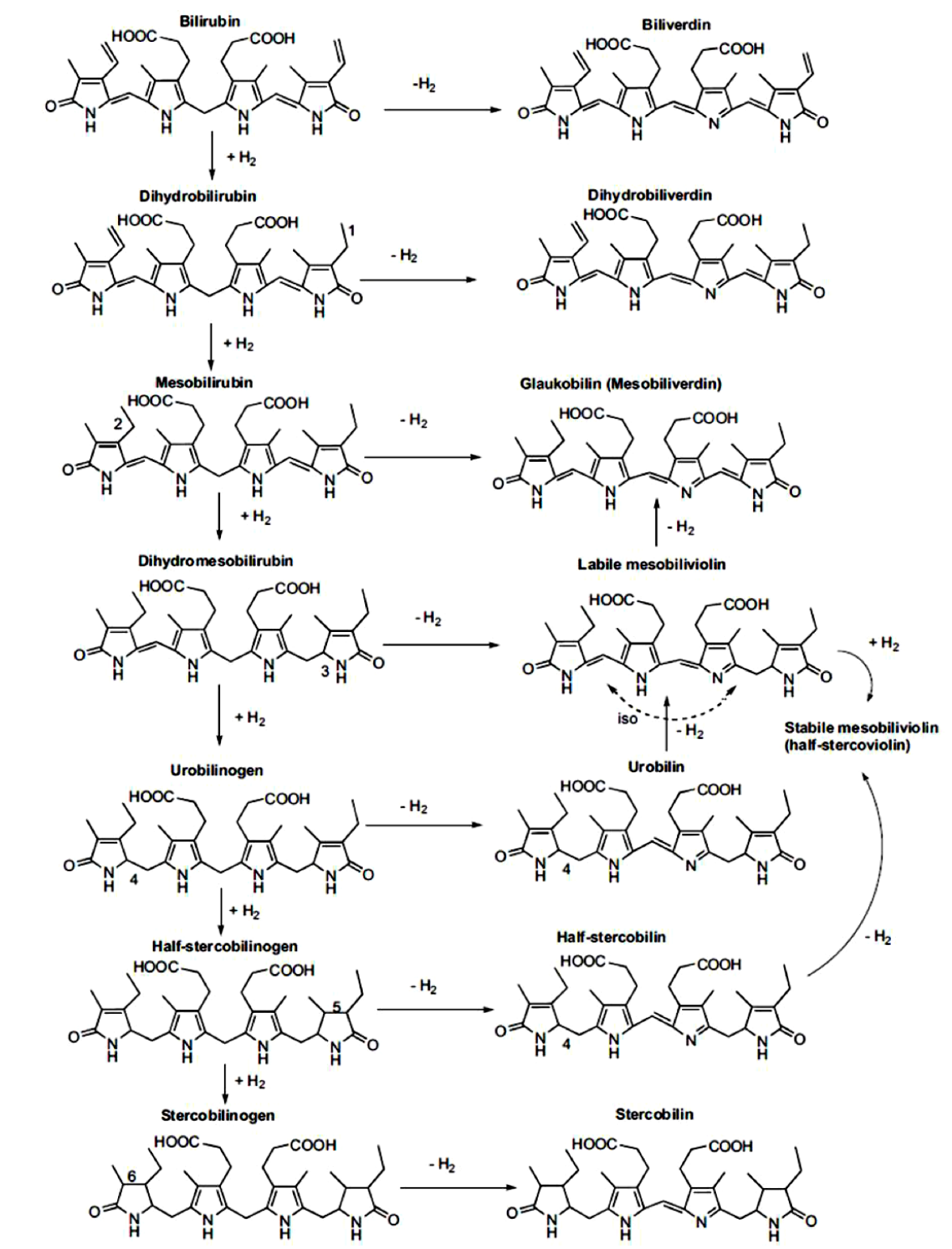


Figura 15. Reazioni di riduzione ed ossidazione subite dalla bilirubina a livello intestinale.

Tratto da: Vitek e Ostrow 2009.

In seguito, i batteri anaerobi intestinali compiono reazioni di ossidazione a livello del ponte metilenico centrale, lo stercobilinogeno viene convertito in stercobilina (-H₂) e l'urobilinogeno in urobilina (-H₂): questi composti appartengono alla famiglia degli urobilinoidi, che vengono eliminati con le feci dandone il colore. Una piccola concentrazione di UCB e di urobilinoidi subisce la circolazione entero-epatica, ovvero attraverso la vena porta raggiungono l'intestinale, dove vengono assorbiti per poi passare al fegato. In questo organo la maggior parte degli urobilinoidi viene processato e ri-escreto nella bile, mentre il 70% della UCB penetra nella circolazione sistemica. Il catabolismo degli urobilinogeni è preponderante in condizioni fisiologiche, infatti nell'adulto vengono eliminati tramite le feci 50-250mg/die di urobilinoidi ma solo 5-20mg/die di bilirubina.

5. Meccanismi di trasporto nel fegato

Molte molecole endogene ed esogene vengono trasportate a livello epatico mediante trasportatori. Altre molecole, invece, come i cationi organici lipofili, ad esempio la Rodamina B (Braakman et al. 1989); i farmaci anticolinergici e la Detropina (Van der Sluijs et al. 1987) attraversano la membrana per diffusione passiva.

Nella membrana sinusoidale sono presenti trasportatori sia specifici che multispecifici. Del primo gruppo fanno parte i trasportatori specifici per la colina, la tiamina (Singleton e Martin 2001) e l'N-metilnicotinammide (Green et al. 1999). Del secondo gruppo invece fanno parte:

- La famiglia degli NTCP (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide): azione specifica per il taurocolato ed in misura minore per ilcolato. Questo trasportatore è importante anche nell'assorbimento dei sali biliari coniugati, della sulfobromoftaleina, dell'1-anilino-8-naftalensolfonato e di steroidi coniugati (Peter J. Meier e Stieger 2002).
- La famiglia degli OAT: sono trasportatori di anioni organici della famiglia SLC22A, localizzati in diversi tessuti come reni, cervello e placenta (Koepsell e Endou 2004). Sono costituiti da 12 domini transmembrana riorganizzati in due set di 6 eliche (K. Y. Jung et al. 2001).

In particolare: gli OAT2 sono localizzati principalmente nel fegato e poco nel rene; gli OAT3 regolano la pressione arteriosa e per questo si è ipotizzati di usarli come farmaci antipertensivi (Eraly 2008); gli OAT4 sono localizzati nella membrana degli enterociti dell'orletto a spazzola;

gli OAT7 nel fegato. Inoltre, gli OAT sono importanti anche per l'eliminazione e la distribuzione di molti farmaci nefrotossici e tossine uremiche (Shitara, Sato, e Sugiyama 2005).

- La famiglia degli rOCT (“rat Organic Cation Trasporter”): questo trasportatore è localizzato nel tubulo prossimale del rene e nel piccolo intestino; inoltre, a livello del fegato l'isoforma rOCT1 è specifica per i cationi organici ed è un trasporto di tipo elettrogenico, non dipendente dal gradiente di Na^+ o H^+ (Muller e Jansen 1997).
- La famiglia degli OATP consiste in trasportatori polipeptidici di anioni organici (Peter J. Meier e Stieger 2002). L'OATP1 è coinvolto nel trasporto di sali biliari, steroidi coniugati, ormoni tiroidei, prostaglandine e della sulfobromoftaleina; è poco espresso a livello epatico, ma molto espresso nel cervello e nel rene; l'OATP2 e l'OATP8 hanno diversa affinità per la forma coniugata della bilirubina. Infatti, solo OATP2 sembrerebbe coinvolto nel trasporto della bilirubina ed in particolare nelle condizioni di iperbilirubinemia (Cui et al. 2001).

Questa famiglia include anche la forma espressa nel ratto, rOATP (P J Meier et al. 1997).

- La bilitraslocasi: è un trasportatore di membrana specifico per la bilirubina (Sottocasa, Lunazzi, e Tiribelli 1989) ed appartiene alla famiglia chiamata The Bilirubin Transporter (BRT) Family, identificata con il codice 2.A.65. Il capostipite di questa classe è la bilitraslocasi 2.A.65.1.1 (Saier 2000), che è localizzata a livello sinusoidale (Baldini et al. 1986) e presenta un sito di legame ad alta affinità per il pigmento (L Battiston et al. 1998).

Molti flavonoidi, per esempio, sono di natura idrofila (come gli antociani) per questo non possono attraversare le membrane cellulari mediante un meccanismo di diffusione passiva, ma sono necessari dei trasportatori specifici che permettano il passaggio dal lume intestinale al sangue e, da qui, ai diversi organi e tessuti. Hollman et al. hanno dimostrato che i glucosidi di quercetina raggiungono gli eritrociti attraverso il trasportatore per il glucosio Na^+ -dipendente (SGLT 1) (Hollman et al. 1995), successivamente all'interno della cellula i glucosidi vengono idrolizzati da una β -glucosidasi citosolica (Day et al. 2000).

Ma queste molecole naturali interagiscono anche con altri trasportatori di membrana come la bilitranslocasi e i trasportatori ABC.

6. La bilitranslocasi

La bilitranslocasi (T.C. 2.A.65.1.1) è localizzata al polo sinusoidale delle cellule epatiche ed è presente anche a livello della mucosa gastrica (Baldini et al. 1986) e a livello dei tubuli renali (Elias et al. 1990) e trasporta anioni organici, come per esempio l'acido nicotinico, la solfobromoftaleina (BSP) (Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005), il Cibacron Blue e alcuni flavonoidi ((S Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002; Karawajczyk et al. 2007) oltre che la bilirubina.

Nel fegato facilita il trasporto degli anioni organici dal sangue portale (Sottocasa et al. 1996), mentre a livello gastrico favorisce l'assorbimento degli additivi alimentari, come l'acido nicotinico (Sabina Passamonti, Battiston, e Sottocasa 2000)).

La bilitranslocasi è un peptide con una massa molecolare pari a 38 kDa, ottenuta dopo separazione in SDS-PAGE in condizioni riducenti. Inoltre, il suo punto isoelettrico è maggiore di 9.0, ma nonostante questo, la proteina è molto solubile in acqua a concentrazioni saline fisiologiche (Sottocasa, Lunazzi, e Tiribelli 1989; Sottocasa et al. 1982).

6.1. Purificazione della bilitranslocasi

La bilitranslocasi fu purificata partendo da frazioni subcellulari di fegato di ratto arricchite di membrana plasmatica in base alla sua proprietà di legare la solfobromoftaleina (BSP) (Tiribelli et al. 1978). Questa molecola è un colorante ed un analogo funzionale della bilirubina, infatti diversi studi in vivo hanno stabilito che la BSP inibisce la captazione epatica della bilirubina (Scharschmidt, Waggoner, e Berk 1975).

Quindi, se si dimostrasse che la bilirubina è substrato di tale proteina, si potrebbe affermare che la proteina che lega la BSP è anche il trasportatore della bilirubina. Per confermare questo studio, vennero prodotti degli anticorpi policlonali, digeriti in frammenti Fab che agissero contro la proteina purificata ed infine vennero iniettati nella vena porta dei ratti. Negli animali si verificò un'iperbilirubinemia, questo suggeriva un'azione inibitoria dell'anticorpo, che era selettiva per il trasportatore della bilirubina (Tiribelli et al. 1978). Questo dimostrò l'esistenza di una proteina trasportatrice della bilirubina e legante anche la solfobromoftaleina, che venne chiamata bilitranslocasi.

Successivamente, ulteriori studi indentificarono meglio la bilitraslocasi purificata grazie ad una ricostituzione del trasporto della sulfobromoftaleina in liposomi (Sottocasa et al. 1982) e vescicole di ratto.

6.2. La struttura primaria della bilitranslocasi

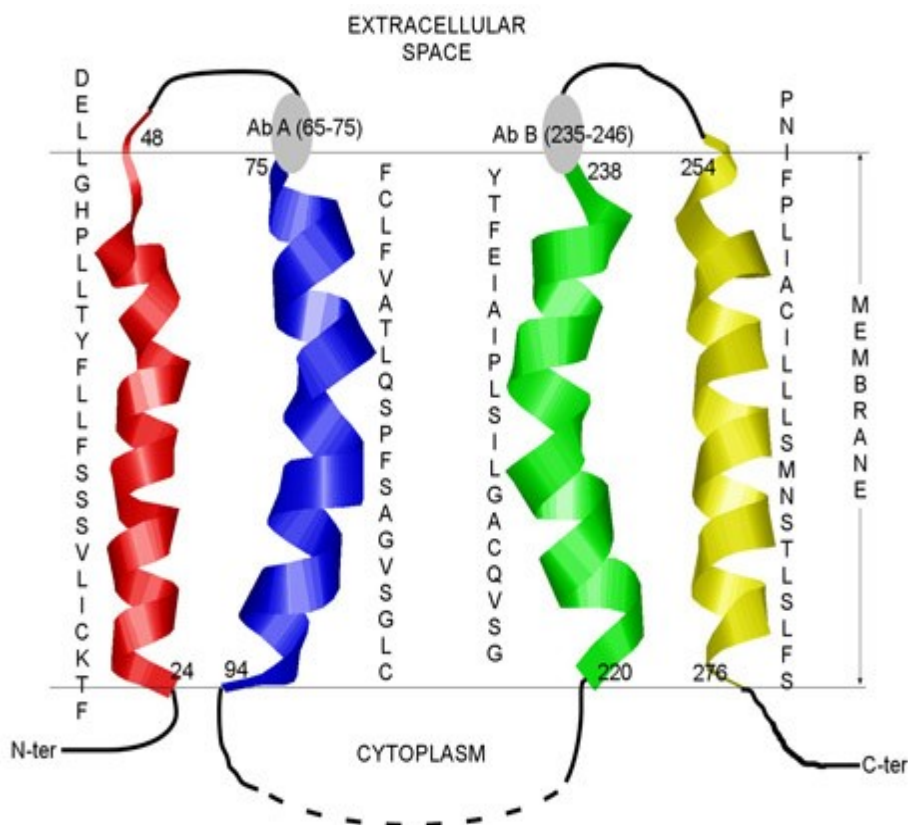


Figura 16. Assetto della bilitranslocasi a livello della membrana plasmatica. Tratto da:
Perdih et al. 2012.

La struttura primaria della bilitraslocasi è stata ottenuta da una sequenza di cDNA (figura 16) (L Battiston et al. 1998). Un clone della proteina, ricavato da una genoteca di cDNA di fegato di ratto ed espresso in un fago λ gt11 in *E. Coli*, è stato selezionato usando anticorpi monoclonali prodotti contro una preparazione di bilitraslocasi. L'anticorpo monoclonale, che è stato utilizzato, possiede le seguenti caratteristiche:

- a) se è denaturato risulta essere selettivo per un singolo peptide di 38 kDa, che è presente nella membrana plasmatica di fegato di ratto (requisito essenziale per l'estrazione della proteina in presenza di detergenti);

b) è in grado di inibire la captazione elettrogenica della sulfobromoftaleina nelle vescicole (quindi inibizione della bilitraslasi).

Il clone selezionato conteneva una sequenza di DNA ignota in letteratura e, purtroppo, incompleta. Applicando la tecnica RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA-Ends-Polymerase Chain Reaction), è stato possibile sequenziare un frammento poli-adenilato di mRNA, il cui terminale 5' si sovrapponeva al terminale 3' del cDNA clonato, ed in questo modo, è stato possibile ricostruire la sequenza codificante l'intera proteina.

Studiando e confrontando la sequenza nucleotidica della bilitraslasi con altre proteine presenti in banca dati, non si riescono ad indentificare grosse omologie, se non la presenza di un segmento codificante un dominio di 19 aminoacidi. La bilitraslasi corrisponde, però, per il 97% ad un filamento antisense della ceruloplasmina, che è una proteina plasmatica sintetizzata a livello epatico ed è coinvolta nel trasporto plasmatico del rame (Shim e Harris 2003).

Dopo aver indentificato la struttura chimica è stato possibile sintetizzare due anticorpi policlonali antisequenza, che possedevano le seguenti caratteristiche:

- Riconoscere una proteina del peso di 38 kDa nella mucosa gastrica di ratto e nella membrana plasmatica di fegato di ratto (Lucia Battiston et al. 1998; Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005; L Battiston et al. 1999; Sabina Passamonti, Cocolo, et al. 2005a);
- Interagire attivamente con la proteina purificata (Lucia Battiston et al. 1998);
- Inibire il trasporto elettrogenico di BSP in vescicole di membrana di fegato di ratto (Lucia Battiston et al. 1998; Sabina Passamonti, Cocolo, et al. 2005). Inoltre, l'attività dell'anticorpo è ridotta con concentrazioni crescenti di bilirubina e acido nicotinico (Lucia Battiston et al. 1998a; Sabina Passamonti, Cocolo, et al. 2005), e ciò porterebbe indicare che vi sia una competizione tra anticorpo e bilirubina per uno stesso sito di legame a livello del trasportatore;
- Riconoscere epitopi cellulari superficiali su epatociti primari di ratto (Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005);
- Inibire il trasporto cellulare di BSP, bilirubina (Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005a) e malvidina 3- glucoside (Sabina Passamonti et al. 2005).

6.3. Substrati della bilitranslocasi:

6.3.1. Bilirubina

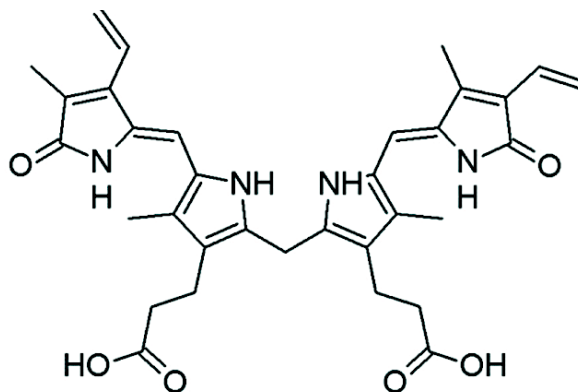


Figura 17. Struttura chimica della bilirubina. Tratto da: Tewari et al. 2017.

Il principale substrato della bilitranslocasi è la bilirubina (figura 17), essa è costituita da un acido tetrapirrolidincarbossilico, ovvero due unità dipirroliche connesse da un C10 tetraedrico. È una molecola con bassa solubilità in soluzioni fisiologiche, prodotta dall'uomo in una quantità di 300 mg/die, ed è per l'80% un derivato del catabolismo del gruppo eme dell'emoglobina e per il restante 20% un derivato del catabolismo di altre emeproteine, come ad esempio il citocromo (Paul D. Berk et al. 1969). La bilirubina è biodisponibile principalmente nella forma isomerica IX α e nel plasma è quasi completamente associata all'albumina serica (Jacobsen 1969), che ne riduce la tossicità (Brodersen e Stern 1990b). La formazione del complesso bilirubina-albumina è un processo reversibile, con costante di dissociazione (K_d) moderatamente bassa e che permette di ottenere una concentrazione plasmatica di bilirubina libera in grado di essere solubilizzata in un mezzo acquoso ad un pH di 7,4 (Frandsen e Brodersen 1986).

Gli epatociti utilizzano un meccanismo altamente selettivo per rimuovere la bilirubina non coniugata dal plasma (Paul D. Berk et al. 1969). Questo sistema prevede l'azione sinergica di diversi fattori come per esempio: i trasportatori a livello sinusoidale o le altre proteine citoplasmatiche leganti anioni, o ancora di un efficiente sistema di coniugazione intraepatica, della UDP-glucuronil trasferasi, ed infine di un efficiente sistema di escrezione biliare.

Diversi studi hanno dimostrato che l'anticorpo inibisce il trasporto elettrogenico della sulfobromoftaleina, questo ha suggerito che nel meccanismo di trasporto viene coinvolta la

sequenza conservata (Lucia Battiston et al. 1998a). Inoltre, sono stati effettuati anche una serie di esperimenti che valutavano l'effetto di concentrazioni crescenti di bilirubina sulla cinetica d'inibizione del trasporto elettrogenico di sulfobromoftaleina da parte dell'anticorpo in vescicole di membrana plasmatica. Questi studi sopracitati hanno dimostrato una diminuzione della velocità d'inibizione da parte dell'anticorpo ed è stato possibile calcolare la costante di dissociazione del complesso bilitraslocasi-bilirubina, ottenendo una $K_d=2$ nM (Lucia Battiston et al. 1998b).

6.3.2. Antociani

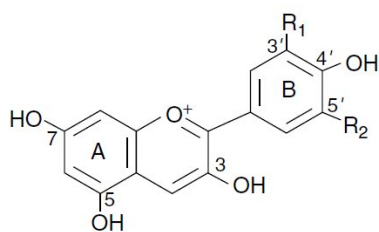
Come descritto precedentemente, gli antociani sono una sottoclasse dei flavonoidi molto presente nella frutta rossa, nell'uva e nei vini (Clifford 2000).

Nelle piante i principali antociani presenti sono i 3-Oglucosidi o 3,5-O-diglucosidi, mentre gli agliconi sono disponibili in minima quantità (Mazza e Miniati 2017). Inoltre, la presenza di agliconi in molte preparazioni alimentari può essere trascurata grazie al legame glucosidico che risulta essere abbastanza stabile.

Recentemente è stata osservata una somiglianza tra antociani e ftaleine, supponendo quindi che gli antociani potrebbero essere substrato della bilitranslocasi.

Tramite test in vitro in vescicole di fegato di ratto, è stato possibile osservare che molti di essi agiscono come inibitori competitivi del trasporto elettrogenico della BSP ed hanno una K_i tra i 2-20 μ M.

Da questi studi è stato possibile capire che i ligandi migliori sono i mono e diglucosidi perché sembra che sia l'anello piranosico ad avere un ruolo importante nel legame. Infatti, minime variazioni posizione C4-C5 modificano il tipo di interazione con la bilitraslocasi, passando da un'inibizione competitiva ad una non competitiva. Inoltre, solamente l'estere para-cumarico della malvidina 3-Oglucoside non interagisce con il trasportatore per motivi di ingombro sterico (figura 18).



$R_1 = H$	$R_2 = H$	: Pelargonidin (Pg)
$R_1 = OH$	$R_2 = H$	: Cyanidin (Cy)
$R_1 = OH$	$R_2 = OH$	: Delphinidin (Dp)
$R_1 = OCH_3$	$R_2 = H$	: Peonidin (Pn)
$R_1 = OCH_3$	$R_2 = OH$	: Petunidin (Pt)
$R_1 = OCH_3$	$R_2 = OCH_3$	: Malvidin (Mv)

Figura 18. Struttura chimica di base degli antociani. Pelargonidina $R_1=H$, $R_2=H$; Cianidina $R_1=OH$, $R_2=H$; Delfinidina $R_1=OH$, $R_2=OH$; Peonidina $R_1=OCH_3$, $R_2=H$; Petunidina $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$; Malvidina $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$. Tratto da: Manach et al. 2004.

6.4. Bilitranslocasi come trasportatore di flavonoidi

6.4.1 Nel fegato

Dopo aver considerato la localizzazione del trasportatore sulla membrana sinusoidale dell'epatocita, la struttura, la specificità del sito attivo per bilirubina e le caratteristiche del sito stesso, si può affermare che il ruolo della bilitranslocasi nel fegato sia quello di mediare il trasporto dei suoi substrati dal sangue portale alle cellule parenchimali.

La bilirubina, per esempio, può essere trasportata dal trasportatore OATP2, che è espresso nel fegato umano, ma con bassa affinità (K_d stimata intorno ai 160 nM) (Krinsky 1992) e probabilmente gioca un ruolo importante solamente nelle forti iperbilirubinemie.

La costante di dissociazione (K_d) è un parametro farmacodinamico che indica l'affinità che un farmaco possiede per il proprio recettore ed è l'inverso della costante di associazione (K_a). Una K_d piccola indica molta affinità per quel recettore. In termini pratici la K_d è quella concentrazione che serve a saturare il 50% dei siti di legame presenti. Più è bassa la concentrazione che serve per saturare il 50% dei legami presenti, più la molecola è potente (più la K_d è bassa più la molecola sarà potente).

Dato che la bilitraslocasi presenta una costante di dissociazione ($K_d = 2 \text{ nM}$) maggiore di due ordini di grandezza rispetto all'OATP2 parrebbe essere più adatta per rimuovere il pigmento dal plasma in condizioni fisiologiche.

Inoltre, anche le antocianine alimentari, comprese quelle glicosilate, presenti nel plasma dopo l'assorbimento orale (Providência, 2006), vengono probabilmente trasportate a livello della membrana plasmatica basolaterale del fegato dalla bilitraslocasi (S Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002, Karawajczyk et al. 2007, S. Passamonti, Vanzo, et al. 2005). Quindi, le caratteristiche protettive proprie degli antociani potrebbero ridurre i danni causati dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e quindi proteggere il fegato (Tsuda et al., 2006; Lima, Fernandes-Ferreira, e Pereira-Wilson 2006).

6.4.2. Nello stomaco

A livello dello stomaco non è ancora chiaro il ruolo fisiologico della bilitraslocasi, dato che è una proteina di trasporto, si è ipotizzato che promuovesse il trasferimento di substrati introdotti con la dieta dal lume gastrico alla mucosa e poi al sangue portale.

I flavonoidi, per esempio, sono polifenoli vegetali molto frequenti nella dieta umana (Bravo 1998). Di recente, l'interesse verso questi composti è aumentato grazie alla loro possibile interazione con i radicali dell'ossigeno, che causerebbero effetti protettivi a livello cardiovascolare o nella prevenzione dei tumori (van't Veer et al. 2000). Tuttavia, è ancora poco chiaro il meccanismo di assorbimento nel tratto gastrointestinale e quindi la loro distribuzione, il loro metabolismo e la loro escrezione.

L'assorbimento dei flavonoidi, infatti, per molto tempo è stato considerato trascurabile a causa della loro coniugazione con uno zucchero, ma in realtà, sia gli agliconi (A. Scalbert e Williamson 2000), che i flavonoidi glicosilati, vengono assorbiti dal piccolo intestino (Hollman e Katan 1999), quindi è possibile che le antocianine possano entrare in circolo tramite un meccanismo non ancora del tutto chiaro.

Di fondamentale interesse è la bilitraslocasi che potrebbe interagire con gli antociani e determinare effetti protettivi verso i danni ossidativi indotti da composti presenti nella dieta (Halliwell, Zhao, e Whiteman 2000). Inoltre, il meccanismo d'azione della bilitraslocasi potrebbe spiegare come vengano trasportate le antocianine glicosidiche intatte dal lume gastrico al sangue.

6.4.3. Nel tratto gastrointestinale

A livello del tratto gastrointestinale l'assorbimento dei flavonoidi parrebbe trascurabile a causa della loro coniugazione con una o più unità zuccherine, ma in realtà, sia gli agliconi (A. Scalbert e Williamson 2000), che i flavonoidi glicosilati, vengono assorbiti dal piccolo intestino (Hollman e Katan 1999) ed è quindi possibile che entrino in circolo, tramite un meccanismo non ancora del tutto chiaro.

Studi in vivo nel ratto hanno dimostrato che la bilitranslocasi trasporta gli antociani, introdotti con la dieta, a livello gastrico (Sabina Passamonti et al. 2003) e dopo l'assorbimento potrebbero proteggere dai danni ossidativi (Halliwell, Zhao, e Whiteman 2000).

6.4.4. Nel rene

La bilitranslocasi è localizzata a livello della membrana basolaterale dei tubuli contorti prossimali e distali (Elias et al. 1990). Essa trasporta gli antociani dal sangue dei capillari peritubulari alle cellule tubulari (Vanzo et al. 2008), prima tappa dell'escrezione urinaria di anioni organici. La seconda tappa è il trasporto dalla cellula tubulare al lume del tubulo, che coinvolge anche altri trasportatori, forse le proteine ABC (Glavinas et al. 2004).

6.4.5. Nell'endotelio vascolare

Studi di immunocitochimica e immunoblotting, hanno dimostrato mediante anticorpi anti-sequenza della BTL, la presenza di questo trasportatore in cellule della linea Ea.hy 926 ed in cellule endoteliali primarie di aorta di ratto (Maestro et al. 2010).

L'attività della BTL è stata misurata mediante il trasporto della BSP in cellule endoteliali, inibita sia da anticorpi specifici che dalla quercetina (appartenete alla classe dei flavonoidi). Quindi, l'uptake della quercetina, come anche della malvidina 3-glucoside, viene inibito da anticorpi specifici, inoltre l'uptake della quercetina, viene inibito dalla bilirubina (Maestro et al. 2010). Questo suggerisce che l'assorbimento di alcuni antociani nell'endotelio vascolare avviene attraverso la BTL, trasportatore di membrana specifico per la bilirubina.

Inoltre, altri studi dimostrano che la BTL potrebbe essere espressa anche a livello della barriera emato-encefalica e determinare perciò la permeabilità di questa alla bilirubina. Infatti, uno studio recente condotto nel nostro laboratorio, dimostra che il C3G ha un'ampia

distribuzione se somministrato per via endovenosa, che coinvolge anche il cervello. Nonostante la molecola sia idrofila e possiede proprietà chimiche sfavorevoli per il passaggio della membrana cellulare, è possibile che il trasporto sia mediato da uno o più specifici meccanismi di trasporto (come per esempio la BTL). Infatti, è stato dimostrato che C3G attraversa la membrana delle cellule endoteliali in un breve lasso di tempo (< 1 min) (Fornasaro et al. 2016). Ciò apre nuove prospettive future sull'effetto dell'interazione antociano-bilirubina sulla BTL a livello dell'endotelio vascolare.

Obiettivi della tesi

Nuove conoscenze sull'omeostasi della bilirubina servono per comprendere il ruolo sistemico di questo pigmento, e in particolare nel cervello (Fujiwara et al. 2018). Conoscere certe funzioni epatiche può essere strategico per comprendere alcuni aspetti importanti come varia la bilirubinemia indiretta nelle condizioni di salute e malattia e come i piccoli incrementi di bilirubinemia possano abbassare il rischio di malattie croniche, e in particolare quelle neurodegenerative legate all'età.

Il trasporto della BR attraverso la BBB (barriera ematoencefalica) richiede dei trasportatori di membrana. Eppure, allo stato attuale, non si conoscono nemmeno i meccanismi molecolari coinvolti nel trasporto della bilirubina nel fegato. Perciò questa ricerca ha avuto l'obiettivo di chiarire questo punto per facilitare il progresso in tutti gli ambiti.

Per condurre la ricerca in questo ambito, si è ritenuto essenziale disporre di un metodo analitico ad alta prestazione e sensibilità, che consentisse l'analisi della bilirubina frazionata (libera e coniugata) in soluzioni fisiologiche, anche in assenza del suo veicolo fisiologico, l'albumina.

Si è voluto caratterizzare l'uptake della bilirubina in diverse linee cellulari in coltura, ed osservare l'effetto di inibitori specifici di noti trasportatori di anioni organici endogeni (come la bilirubina) e xenobiotici (farmaci e certi composti naturali vegetali). I trasportatori considerati sono quelli delle famiglie SLCO (organic anion transporting polypeptides) e la bilitranslocasi.

Si è voluto caratterizzare anche l'uptake della bilirubina e la sua modulazione da parte di noti inibitori reversibili e irreversibili di questi trasportatori di membrana nel modello sperimentale di fegato isolato e perfuso.

In questo progetto, abbiamo usato per la prima volta un antociano puro (come la cianidina 3-glucoside), quale inibitore reversibile ad elevata affinità della bilitranslocasi (S Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002), che viene trasportato negli epatociti (S. Passamonti, Vanzo, et al. 2005). È il pigmento tipico della frutta rossa, dell'uva e del vino. L'effetto di queste molecole sul trasporto epatico della bilirubina non è mai stato studiato, sebbene sia strutturalmente analogo alla BSP (S Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002).

Si è esaminato, quindi, l'effetto d'inibitori dei trasportatori epatici di anioni organici sull'uptake della bilirubina. Essi sono la pravastatina e l'estradiolo 17 β -D-glucuronide, che inibiscono il trasportatore epatico sinusoidale Oatp1b2 (Meyer Zu Schwabedissen et al. 2009), l'ortologo murino dei trasportatori OATP1B1 e OATP1B3, che si ritiene possano trasportare la bilirubina (Čvorović e Passamonti 2017a). Nessuno di questi inibitori interagisce con la bilitranslocasi (Zuperl et al. 2011). Non sono note interazioni degli antociani con i trasportatori Oatp (Stieger, Mahdi, e Jager 2017).

Inoltre, questa ricerca ha avuto l'obiettivo di applicare il metodo, usato per l'analisi della BR e BRG in soluzioni fisiologiche, all'analisi della bilirubina frazionata nel sangue umano, in modo da approfondire la comprensione del metabolismo umano della bilirubina mediante studi clinici d'interesse neurologico, tesi a comprendere la relazione tra bilirubina (indiretta, non coniugata) e stili di vita o malattie.

Materiali e metodi

1. Reagenti ed abbreviazioni

- Zoletil (Virbac)
- Xylazine (Dechra)
- Eparina (Rovi)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (**PBS**) (SIGMA Life Science, SLCB9248)
- Dimetil sulfossido (**DMSO**) (Sigma Aldrich, SHBM2271)
- Acido tricloroacetico (TCA) (Sigma Aldrich)
- Acido cloridrico (HCl) (Sigma Aldrich)
- Cianidina 3-glucoside (**C3G**) (Extrasynthese, 0915S)
- Malvidina 3-glucoside (**M3G**) (Extrasynthese, 0911S)
- Peonidina-3-O-glucoside chloride (**P3G**) (Extrasynthese, 0929S)
- Resveratrolo (3,4',5- Triidrossi- trans- stilbene) (**RESV**) (SIGMA, R-5010)
- Bilirubina (**BR**) (Sigma-Aldrich, B4126)
- Bilirubina glucuronide (**BRG**)
- Pravastatina sale sodico idrato (PRV) (Sigma Aldrich, P4498)
- β -estradiolo 17 (β -D-glucuronide) sale sodico- (**E17G**) - (Sigma Life science, E1127)
- Ketoprofene (Sigma Life science, K1751)
- Indometacina minimo 99% TLC (Sigma Life science, I7378)
- HELP-UnaG (**HUG**) proteina di fusione (Bandiera et al., 2020)
- β -Glucuronidasi da *Escherichia coli* (Sigma Life science, 50180211)
- Lattato deidrogenasi (**LDH**) (Sigma-Aldrich, *In Vitro* Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based)
- Adenosina trifosfato (ATP) (Promega, CellTiter-Glo® 2.0 Assay)
- Albumina, Bovina, Fraction V (SIGMA, 12K1608)
- FITC (BDH biochemicals)

1.1. Soluzioni

- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (0.26mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.44mM KH_2PO_4 , 4.17mM NaHCO_3 , 136.9mM NaCl , 0.34mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.6mM Glucose, 0.4mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.4mM KCl , pH 7.4)
- Tampone fosfato salino (PBS) (136.9 mM NaCl , 2.7 mM KCl , 10.0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4)
- Tampone fosfato salino con DMSO (PBSD) (PBS, 20% DMSO (vol/vol), 0.2 mM lattato, 2mM piruvato, 2.5mM glucosio)
- 5 % TCA (vol/vol, in acqua)
- 1 M HCl (in acqua)
- β -Glucuronidase (800 U/mL in PBS)
- Albumina-FITC (0.002 mM)
- Eparina (500 U in PBS)

1.2. Composti utilizzati

Composti	[Composti] nel bolo (mM)	nmol iniettate	Sinusoidale influx	Sinusoidale efflux
Bilirubina CHEBI:16990	0.05	10	Bilitranslocasi (BTL) (TCDA 2.A.65.1.1)	Sconosciuto
Cianidina 3-glucoside CHEBI:28426 Malvidina 3-glucoside CHEBI:31799 Peonidina 3-glucoside CHEBI:74793	0.5-2	100-400	Bilitranslocasi (BTL) (TCDA 2.A.65.1.1)	Sconosciuto
Pravastatina CHEBI:63618	6	1200	Oatp2 (Slco1b2); Oat2 (Slc22a6)	Sconosciuto
Estradiolo-17 β- glucuronide CHEBI:791	1	200	Oatp1, Oatp2 (Slco1b2)	Mrp3 (Abcc3)
Indometacina CHEBI:49662	1	200	Oat2 (Slc22a7); OATP1B1, OATP1B3 (SLCO1B1, SLCO1B3), OATP2B1 (SLCO2B1); OST α -OST β (Slc51)	Mrp3 (Abcc3)
Ketoprofene CHEBI:6128	1	200	Oat2 (Slc22a7)	Sconosciuto
Trans-resveratrolo CHEBI:45713	2	400	OATP1B1, OATP1B3 (SLCO1B1, SLCO1B3), OATP2B1 (SLCO2B1)	Sconosciuto
Bilirubina glucuronide (*)	n.a.	n.a.	Oatp1, Oatp2 (Slco1b2)	Mrp3 (Abcc3)

Tabella 1. I composti consegnati come boli intraportali a passaggio singolo sono codificati secondo il dizionario Entità chimiche di interesse biologico (ChEBI). I loro trasportatori di membrana epatica bersaglio (ortologi di ratto, se non diversamente specificato) sono identificati dai loro codici genici o dal codice Transporter Classification Database (TCDB), se geneticamente orfani. (*) La bilirubina (mono)glucuronide è il prodotto endogeno della reazione catalizzata da UGT1A1. n.a., non applicabile.

1.3. Caratteristiche chimiche e farmacologiche dei composti testati

1.3.1. Cianidina 3-glucoside

La cianidina 3-glucoside, come descritto precedentemente appartiene alla classe degli antociani, che sono dei pigmenti disciolti nella linfa vacuolare dei tessuti epidermici di fiori e frutta. Essi assumono una colorazione tipica rosa, rossa, celeste o viola (Mazza 1995) a seconda del pH che modifica la loro struttura chimica, rendendoli colorati o meno. A livello dei tessuti vegetali, gli antociani nella forma agliconica (antocianidine), nonostante siano per loro natura instabili e facilmente degradabili, risultano resistenti alla luce, al pH ed a ossidazione severa; mentre sia la glicosilazione che l'esterificazione, rispettivamente con un glucosio in posizione tre e con vari acidi organici (acido citrico e acido malico) e acidi fenolici, li protegge dalla degradazione. Inoltre, gli antociani possono essere stabilizzati anche dalla formazione di complessi con altri flavonoidi.

1.3.2. Pravastatina

È un composto appartenente alla classe delle statine, che inibiscono selettivamente e competitivamente l'enzima HMG-CoA reduttasi, che porta alla conversione dell'HMG-CoA in mevalonato, che porterebbe alla formazione del colesterolo endogeno (Newhouse 1986).

È un farmaco ipolipemizzante, di natura idrofila, che ha come bersaglio specifico l'epatocita e sulla sua superficie aumenta il numero di recettori per le LDL, riducendo così la colesterolemia. Inoltre, inibisce la sintesi delle VLDL, precursori delle LDL (Aguilar-Salinas, Barrett, e Schonfeld 1998).

1.3.3. β -estradiolo 17 (β -D-glucuronide) sale sodico

È un estrogeno prodotto principalmente dalle cellule teca e dalla granulosa dell'ovaio. Ha una struttura a 18 atomi di carbonio derivante dall'estrone.

Questo ormone viene secreto dalle gonadotropine ipofisarie (FSH e LH): nell'età prepuberale è responsabile dello sviluppo delle ghiandole mammarie e dei caratteri secondari, mentre durante l'età fertile è responsabile delle modificazioni dell'endometrio e della quantità di muco cervicale, della mobilità tubarica e della ritenzione idrosalina (Berne & Levy, 2018). Viene

utilizzato per gli squilibri ormonali come nella sintomatologia da carenza di estrogeni o nelle menopause chirurgiche o fisiologiche.

L'estradiolo viene trasportato per la maggior parte mediante la proteina vettore Sex Hormone Binding Globuline (SHBG) e dall'albumina, mentre una piccola parte è libera o coniugata come solfato o glucuronato e viene escreta con la bile e l'urina.

1.3.4. Ketoprofene

Appartiene alla famiglia dei FANS ed è un derivato dell'acido propionico, usato per l'artrite reumatoide e osteoartrite (Scott A. Waldman MD PhD FCP, Andre Terzic MD PhD, 2008).

Svolge diverse attività:

- Azione antinfiammatoria (inibizione COX);
- Stabilizzazione della membrana lisosomiale;
- Attività antibradichinica;
- Attività antiaggregante piastrinica (Kantor 1986);
- Attività analgesica: oltre al meccanismo periferico (mediante attività prostaglandine), vi è la presenza anche di un meccanismo centrale non-oppioide (in cui sono coinvolti i recettori del glutammato NMDA, che tramite mediatori biochimici come: sostanza P, 5-HT e prostaglandine inducono, a differenza del meccanismo periferico, un rapido effetto analgesico nel dolore acuto (Díaz-Reval et al. 2004)).

1.3.5. Indometacina

Appartiene alla famiglia dei FANS ed è un derivato metilato indolico dell'acido acetico. La sua attività antipiretica è maggiore di quella di aspirina e paracetamolo, mentre quella analgesica è maggiore di dieci volte dell'aspirina (Rothermich 1966).

È un inibitore non selettivo delle COX, che viene utilizzato in patologie infiammatorie croniche come artrite reumatoide, gotta, spondilite anchilosante ed osteoartrite (Newhouse 1986). Ha un'emivita di appena 2 ore e causa diversi effetti collaterali come disturbi gastro-intestinali, a livello centrale ed ematopoietica (Rainsford et al. 2003).

2. Modello cellulare: linea cellulare SH-SY5Y

In un primo set di esperimenti è stato utilizzato come modello sperimentale cellule di neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266TM) provenienti dalla biopsia di un tumore osseo metastatico umano. Dalla linea parentale SK-N-SH (ATCC® HTB-11TM) tramite tre subclonazioni vengono prodotte le cellule SH-SY5Y: prima si ottengono le SH-SY, poi le SH-SY5 e infine le SH-SY5Y. Queste ultime sono state depositate presso l'ATCC® nel 1970 da June L. Biedler (Amini e White 2013).

Nell'utilizzo di questa linea cellulare, devono essere prese in considerazione tre caratteristiche principali:

- le colture includono cellule sia galleggianti che aderenti, entrambe vitali;
- le cellule SK-NSH differenziate parentali contenevano due cellule morfologicamente distinte fenotipicamente: cellule simil-neuroblasti e cellule simil-epiteliali. Le cellule con morfologia simil-neuroblasti, a differenza di quelle con morfologia epiteliale, sono caratterizzate da attività tirosina idrossilasi (TH) e dopamina- β -idrossilasi, tipiche dei neuroni catecolaminergici (Ross, Spengler, e Biedler 1983);
- le cellule SH-SY5Y possono essere differenziate in un fenotipo neuronale maturo, ad esempio, utilizzando l'acido retinoico (RA).

La forma indifferenziata è caratterizzata da morfologia simil-neuroblastica con pochi e tronchi processi, con cellule sia aderenti che fluttuanti. Inoltre, a differenza di quelli differenziati, continuano a proliferare.

2.1 Linea cellulare HepG2

Le cellule della linea HepG2 provengono da un epatoblastoma umano (BSTLC79). I vantaggi dell'utilizzo di questa linea sono sia che derivano dall'uomo, sia che esprimano un peptide di 38kDa che reagisce con l'anticorpo anti-bilirubina (Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005), rende sicuramente questo modello sperimentale di notevole interesse.

Inoltre, questo tipo di cellule garantisce una sperimentazione più agevole, infatti, sono linee stabilizzate che possono essere mantenute facilmente in coltura. Garantendo, quindi, una

sperimentazione meno laboriosa rispetto alla preparazione di epatociti primari che possono portare facilmente a danni nel modello sperimentale, causati da un'alterazione delle funzioni vitali che possono indurre sofferenza cellulare.

Sia le cellule SH-SY5Y che HepG2 sono state coltivate in mezzo di Eagle modificato di Dulbecco standard di crescita cellulare (DMEM High glucosio, Euroclone) completato con 10% FCS, 1% penna/streptococco e 1% glutammina. Le colture cellulari sono state mantenute a 37°C e 5% CO₂.

2.2 Saggio di trasporto cellulare della bilirubina

Come descritto precedentemente, recenti studi in vitro hanno dimostrato che incubando i neuroni dell'ippocampo con il C3G per tempi brevi (circa 20 minuti), è possibile impedire ad esempio l'apoptosi neuronale indotta da etanolo (effetto neuroprotettivo) (ali Shah et al. 2013). È importante sottolineare però che il C3G si accumula all'interno delle cellule endoteliali del cervello (Milbury e Kalt 2010) e che attraversa la barriera emato-encefalica in modo dipendente dal tempo, in 1 ora (Faria et al. 2010). Partendo dalla letteratura, abbiamo deciso di utilizzare linea cellulare SH-SY5Y per valutare l'ipotesi dell'effetto inibitorio di C3G sull'assorbimento della bilirubina a livello celebrare, misurando il suo decorso temporale.

Lo stesso tipo di esperimenti è stato svolto nelle cellule del fegato HepG2: la bilirubina, tramite il torrente ematico, raggiunge la membrana basolaterale arrivando poi all'epatocita (0,25g/die) (Sabina Passamonti, Terdoslavich, et al. 2005), attraverso un trasporto che potrebbe essere sia attivo che passivo, ma non è ancora del tutto chiaro. La bilirubina potrebbe essere trasportata tramite un trasporto di tipo attivo, perché la concentrazione plasmatica di UCB libera (cioè non legata all'albumina sierica umana - HSA) è minore rispetto alla concentrazione di UCB presente all'interno dell'epatocita (16 nM). Tuttavia, ancora oggi non è né nota né stata selezionata e clonata nessuna proteina di trasporto specifica, ma solo alcuni trasportatori non specifici. Il meccanismo di trasporto della bilirubina a livello delle vescicole isolate di membrana epatica è un movimento rapido e di tipo flip-flop, per questo è possibile che il trasporto del pigmento sia una diffusione spontanea transmembrana e contro gradiente di concentrazione. Anche in questo caso, partendo dalla letteratura, abbiamo deciso di indagare l'effetto della cianidina 3-glucoside sull'uptake della bilirubina.

Il giorno prima dell'esperimento di assorbimento sono state seminate 1×10^6 in una capsula di Petri di 60 mm di diametro (figura 19A).

Il giorno dell'esperimento, il terreno di mantenimento è stato eliminato e le cellule sono state lavate due volte con PBS 1X. Poi sono state preparate due soluzioni da aggiungere alle cellule monostrato:

- Soluzione A: sono stati preparati in una boccetta ambrata per impedire la degradazione della bilirubina, altamente fotosensibile 4 mL di soluzione composta da: PBSA (PBS 1X + 0.4 mg/ml BSA) con bilirubina 30 nM (Sigma, B4126-1G) per il controllo;
- Soluzione B: 4 mL di soluzione composta da: PBSA (PBS 1X + 0,4 mg/ml BSA) con bilirubina 30 nM (Sigma, B4126-1G) con aggiunta di C3G 10 μ M per il trattato.

Dopo l'aggiunta della soluzione A, sono stati effettuati prelievi a tempo a 0, 5, 30, 60, 120, 300 e 900 secondi, raccogliendo 500 μ L di soluzione e addizionandoli immediatamente a 500 μ L di HUG con concentrazione 0.04 mg/mL per le misurazioni del decorso di assorbimento della bilirubina (figura 19B). Il giorno prima dell'esperimento è stata preparata la soluzione di HUG 2mg/mL in acqua milliQ. Quindi, lo stesso giorno dell'esperimento, è stata diluita la soluzione preparata il giorno precedente, ottenendo la soluzione di lavoro HUG 0.04 mg/mL in PBS.

Successivamente, da ciascuna Eppendorf, è stato prelevato il campione (200 μ L/pozzetto, quindi quadruplicato per ogni campione) e posto in una piastra a 96 pozzetti e tenuto 4h al buio e nell'armadio termostato a 25°C, e infine è stata letta la fluorescenza (λ_{ex} = 485; λ_{em} = 485 nm). La curva standard della bilirubina è stata preparata giornalmente.

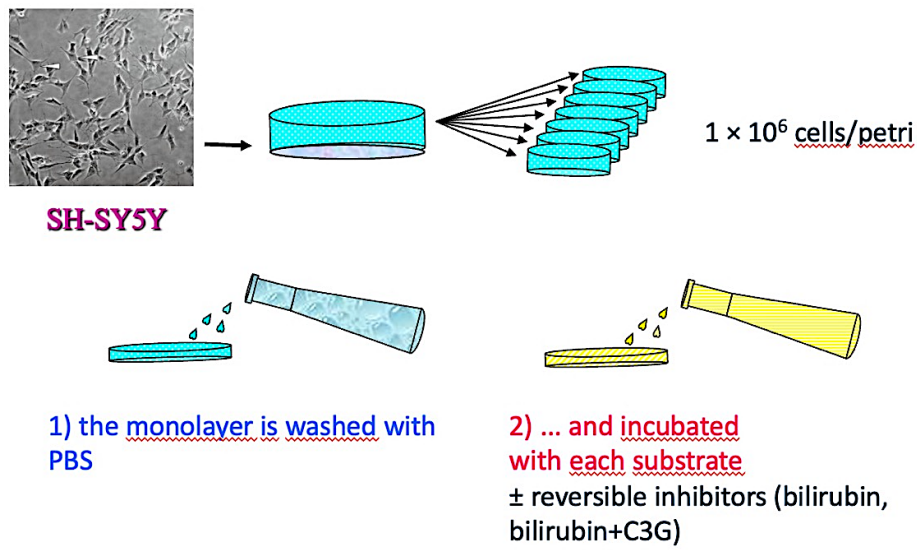


Figura 19A. Saggio di assorbimento della bilirubina nelle cellule SH-SY5Y.

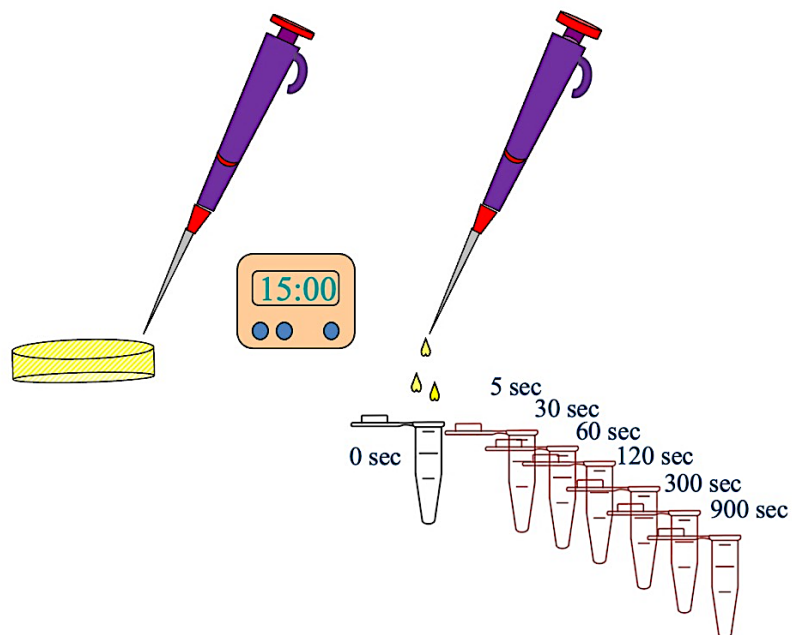


Figura 19B. Saggio di assorbimento della bilirubina nelle cellule SH-SY5Y.

Dopo il saggio di assorbimento, ogni monostrato di cellule è stato trattato con 300 μ L di PBS + 1% di Triton per la quantificazione delle proteine (saggio BCA).

Le picomole di bilirubina assorbita sono state calcolate come segue:

Tempo (sec)	Volume extracellulare (mL)	[nM]	pmoli
0	4.5	30	135
5	4.0	30	120
30	3.5	30	105
60	3.0	30	90
120	2.5	30	75
300	2.0	30	60
900	1.5	30	45

Tabella 2. La tabella rappresenta i diversi time point, il volume extracellulare dopo ogni prelievo, la concentrazione e le pmole ottenute moltiplicando i dati nella colonna 3 per i volumi, in Petri senza cellule. La concentrazione di bilirubina è stata misurata con il metodo HUG ed espressa come nM, facendo riferimento alla curva standard, appena preparata.

Tempo (sec)	Volume extracellulare (mL)	[nM]	pmoli
0	4.5	30	135
5	4.0	29.5	118
30	3.5	29.36	102,76
60	3.0	28	84
120	2.5	27.86	69.65
300	2.0	27.5	55
900	1.5	26.89	40.34

Tabella 3. La tabella rappresenta i diversi time point, il volume extracellulare dopo ogni prelievo, la concentrazione e le pmole ottenute moltiplicando i dati nella colonna 3 per i volumi, in Petri con il monostrato di cellule. La concentrazione di bilirubina è stata misurata con il metodo HUG ed espressa come nM, facendo riferimento alla curva standard, appena preparata.

Le pmole di bilirubina captata sono state calcolate per ogni time point, sottraendo ai valori della colonna 4 della tabella 3 quelli presenti nella colonna 4 della tabella 2.

La messa appunto del saggio di assorbimento è stata aggiustata più volte: inizialmente le Petri erano tenute durante l'esperimento a 0°C poiché, a queste temperature, ci aspettavamo che lo stato metabolico delle cellule rimanesse fisso, ma i risultati ottenuti non erano uniformi e quindi non riproducibili.

Successivamente, è stato utilizzato un tampone BSA (0.4 mg/ml BSA in PBS) che, come dimostrato nel nostro laboratorio (dati non mostrati), è in grado di abbattere il legame tra bilirubina e la plastica delle Petri.

Queste prove sono state fatte per esaminare la possibilità di studiare il ruolo della bilirubina in modelli cellulari in vitro, rilevanti per la biologia cellulare dei neuroni.

Le prove sono state condotte sia sulle cellule neuronali SH-SY5Y che sulle cellule epatiche HepG2. I dati risultano essere incerti e poco riproducibili, dimostrando i limiti del modello sperimentale.

Si deve concludere che questo modello non risponde alle esigenze di comprensione dell'effetto della bilirubina sui neuroni o nel fegato.

Si ritiene, quindi, che studi condotti sul fegato intatto possano essere molto più promettenti: si è deciso di indagare l'uptake della bilirubina in un modello sperimentale più complesso, rispetto alle linee cellulari, quali, ad esempio, il fegato isolato e perfuso.

3. Preparazione del fegato isolato e perfuso di ratto Wistar

Il protocollo per la preparazione del fegato isolato e perfuso di ratto Wistar è stato approvato dal Comitato Etico di Ateneo in accordo con le leggi nazionali (Progetto 3379PAS18, aut. N. 65/2019 – PR del Ministero della salute dd. 28.01.2019).

L'esemplare femmina di ratti Wistar, in accordo con il protocollo sopra citato, è stato anestetizzato con un'iniezione intraperitoneale di tiletamine/zolazepam (1:1.25 mg/kg di peso corporeo) e xylazine (10 mg/kg di peso corporeo) ((Fornasaro et al. 2016).

L'accertamento dell'efficacia dell'anestesia profonda si farà esaminando il riflesso della zampa posteriore. Inoltre si valuterà l'assenza di ogni altro riflesso al tocco delle vibrisse, o alla leggera puntura dell'addome, o ad altre manipolazioni. S'inciderà l'addome dell'animale solo

quando ogni riflesso sarà scomparso. In caso di comparsa di riflessi, anche debolissimi, si somministrerà un piccolo supplemento di anestetico. Per ridurre al minimo lo stress degli animali selezionati per l'esperimento, e quindi anche la variabilità individuale alla risposta all'anestetico, essi saranno ospitati in una gabbia, collocata in un altro vano dello stabulario. Si vuole evitare che i ratti percepiscano scene, rumori e odori provenienti dalla sala chirurgica. È rispettato il principio del *refinement*.

Si eseguirà il protocollo standard di preparazione del fegato isolato e perfuso che prevede diversi steps (Stollman, Gärtner, et al. 1983; T. Sugano et al. 1978; Ahmed et al. 2001; Wolkoff, Johansen, e Goesser 1987; Bessems et al. 2006)

Per prima cosa l'animale viene disteso su un tappetino (addome verso l'alto) e le zampe sono fissate al supporto. Si esegue una laparotomia longitudinale (dal pube all'appendice xifoide) ed una trasversale all'altezza del margine inferiore del fegato. Fare attenzione a non tagliare il diaframma, il torace e i suoi muscoli respiratori in questa fase.

L'intestino viene spostato sul lato sinistro dell'animale per mettere in evidenza l'ilo epatico.

Si preparano due legature: la prima attorno alla vena cava inferiore, sopra la confluenza della vena renale destra e una seconda intorno alla vena porta (a circa 1 cm distalmente dall'ilo).

Successivamente, si isola l'ilo epatico e si preparano alte due legature attorno alla vena porta.

Per prevenire la coagulazione del sangue si inietta un bolo composto da 500 unità di eparina in 250 µl di PBS sono state iniettate nella vena cava inferiore.

In seguito, si incannula la vena porta con ago cannula calibro 20 fissato con la legatura; la cannula è stata bloccata su un tubo di silicone dotato di una porta per l'erogazione del boli e connesso a una pompa peristaltica, che attinge a un recipiente con la soluzione salina fisiologica di perfusione (Hank's balanced solution (HBSS), pH 7.4 per i primi 20 minuti). Il fegato è stato perfuso ad una velocità di flusso di 6 ml / min e ad una temperatura costante di 37 ° C.

Inoltre, si incide la vena cava inferiore, sotto la legatura presso la vena renale destra, per consentire il flusso retrogrado del liquido di perfusione ed evitare danni epatici da aumento della pressione idrostatica intraportale.

Poi, si prosegue con una toracotomia longitudinale per accedere al cuore. Si esegue un taglio della parete dell'atrio destro per inserire un ago cannula calibro 18 nella vena cava inferiore, fissato con una legatura e si estende con un catetere per raccogliere la soluzione di perfusione che scorrono dal fegato nella vena cava inferiore con un flusso di 6 ml/min (figura 20).

A questo punto si cambia la soluzione salina di perfusione precedentemente utilizzata con un tampone fosfato salino denominato PBS (utilizzato per evitare interferenze nella lettura con HUG dei campioni allo spettrofotometro). Si continua la perfusione fino alla completa eliminazione del fluido di perfusione, massaggiando occasionalmente il fegato per favorire la perfusione di un distretto epatico.

La perfusione avviene abitualmente in circa 30-40 minuti, e l'animale muore senza alcuna sofferenza. Infine, quando l'effluente è privo di sangue e il fegato ha completamente virato da rosso-bruno a giallo-bruno, si iniziano le prove.

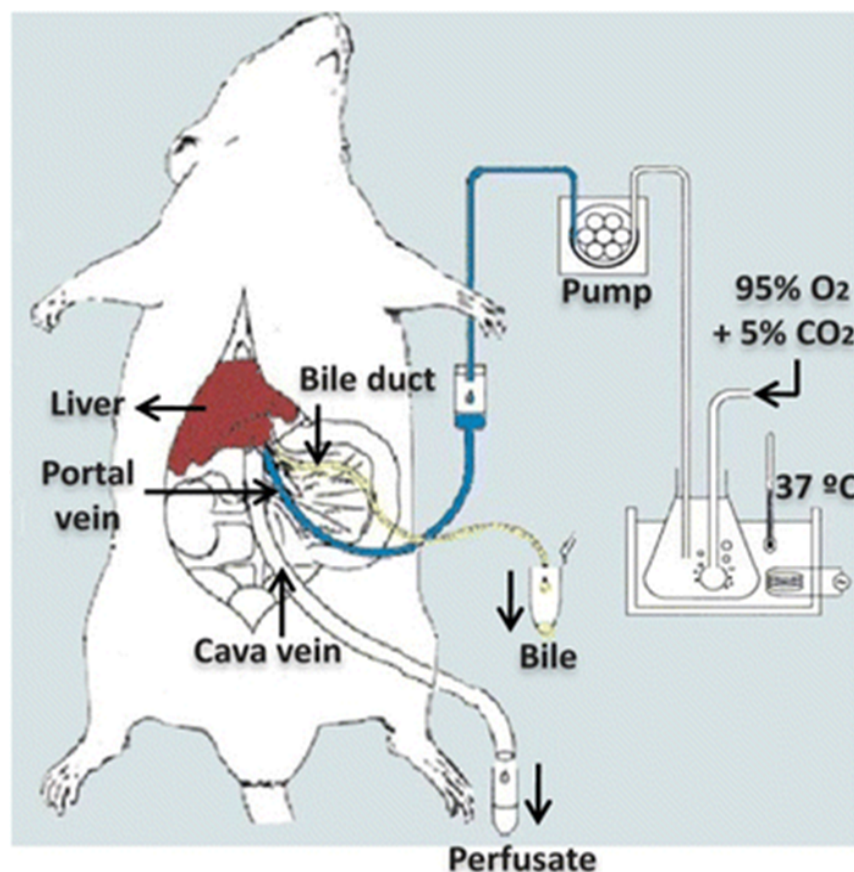


Figura 20. Preparazione di fegato di ratto isolato e perfuso Wistar: anatomia del fegato isolato e perfuso e del suo sistema di perfusione dopo legatura.

3.1. Vantaggi nell'utilizzo della procedura del fegato isolato e perfuso di ratto Wistar

Il fegato isolato e perfuso mantiene intatto il sistema vascolare. Il mezzo di perfusione scorre in modo simile al sangue e l'architettura dell'organo è intatta. La somma del volume vascolare e interstiziale è minore di quello parenchimale (0.35 ml/g fegato (Stollman, Gärtner, et al. 1983).

In queste condizioni, la scomparsa della bilirubina dal mezzo si misura come una netta differenza; più del 50% della bilirubina iniettata viene assorbita dal fegato (Stollman, Gärtner, et al. 1983).

Inoltre, l'escrezione biliare nel sistema canalicolare e biliare è funzionante (Stollman, Gärtner, et al. 1983), è ciò è una forza trainante (*driving force*) dell'uptake. Questa particolare funzione non è preservato del tutto nel modello di fettine di fegato (Terdoslavich et al. 2013).

Nelle colture cellulari, l'assenza di flusso, il limitatissimo volume del monostrato cellulare e l'assenza di un significativo spazio biliare sono notevoli fattori limitanti in termini di dinamica del modello e di analisi.

Il nostro modello mantiene anche intatta la sua architettura cellulare e quindi anche la polarizzazione degli epatociti. Questo fatto è critico per l'esecuzione dell'analisi proteomica mirata. La perfusione con alcuni reattivi covalenti delle proteine consentirà, infatti, di marcare selettivamente le proteine del dominio vascolare della membrana plasmatica. Per questi motivi non è possibile il replacement con altri modelli sperimentali.

L'uptake epatico della bilirubina nel fegato isolato e perfuso è già stato studiato usando la bilirubina radioattiva (Stollman, Gartner, et al. 1983). I dati servono da guida per il disegno sperimentale, e quindi per la riduzione del numero di animali.

Poiché il fegato mantiene la sua vitalità anche in assenza di ossigeno per almeno 30 minuti in ratti a digiuno da 24 ore (Ferrigno et al. 2017), oppure per oltre 120 minuti in ratti nutriti (Bradford et al. 1986), e il processo di assorbimento molto veloce (meno di 1 minuto, Stollman, Gartner, et al. 1983), si possono ripetere sequenzialmente fino a 12 test di uptake della bilirubina nella stessa preparazione (si veda per una simile applicazione Tsukasa Sugano et al. 1978). Ciò permette di aumentare il numero di osservazioni e a ridurre il numero di animali.

Infatti, si utilizzeranno ratti Wistar femmine, per poter sfruttare le conoscenze sulla funzione di trasporto della bilitranslocasi acquisite solo in ratti femmina (S Passamonti, Battiston, e Sottocasa 1998; L Battiston et al. 1999; Sabina Passamonti, Battiston, e Sottocasa 1997; S Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002). Gli animali saranno nutriti (Bradford et al. 1986), in previsione di non utilizzare mezzi di perfusione dotati di una ppO_2 .

3.2. I limiti tecnologici e le prospettive recenti

Tra le ragioni del basso livello di conoscenza sui trasportatori che catalizzano il movimento della bilirubina libera attraverso la membrana plasmatica delle cellule, e in particolare a livello del fegato, c'è la difficoltà di dosare la bilirubina libera. Questa molecola lipofila ha un basso limite di solubilità in acqua (<100 nM) e il suo intervallo fisiologico è 5-30 nM. Inoltre, la molecola è fotosensibile e chimicamente instabile. Sebbene esistano metodi HPLC con sistemi di rilevamento ultrasensibili, che abbiamo contribuito a realizzare (Martelanc et al. 2014; 2016), essi si basano su una strumentazione complessa e sofisticata, richiedono la preparazione del campione e in ultimo utilizzano solventi ad elevato impatto ambientale.

Recentemente, abbiamo sviluppato un dosaggio fluorescente per la bilirubina che può essere eseguito in piastre da 96 pozzetti. Il test si basa su una proteina sintetica bifunzionale (Bento da Cunha 2018; Dolerio 2017), la proteina UnaG (Kumagai et al. 2013) che agisce da biorecettore specifico della bilirubina. Il complesso bilirubina-biorecettore è stabile per almeno 24 ore a 4°C . Questo ci consente di analizzare la bilirubina libera in soluzioni fisiologiche con una procedura facilmente eseguibile, stabile, e che non produce rifiuti speciali.

3.3. Controlli della vitalità epatica

3.3.1. Attività dell'LDH

L'attività della lattato deidrogenasi è stata misurata per esaminare la potenziale citolisi epatica durante l'esperimento. Il saggio di attività della lattato deidrogenasi (LDH) (kit di test tossicologici in vitro, a base di lattica deidrogenasi, Sigma-Aldrich) si basa sulla riduzione del 2-(p-iodofenil) - 3-(p-nitrofenil) -5-fenil tetrazolio cloruro (INT) a INT-formazan ($\epsilon_{690} = 1.42 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) da parte di LDH. È stato raccolto l'effluente del fegato in diversi momenti durante l'esperimento ($t_{0\text{min}}$, $t_{10\text{min}}$, $t_{20\text{min}}$, $t_{30\text{min}}$) ed esaminato. Il NAD ridotto (NADH) risultante viene utilizzato nella conversione stechiometrica di un colorante di tetrazolio. Il composto colorato risultante viene misurato spettrofotometricamente. (Synergy H1; BioTek Winooski, VT) in

assorbanza a una lunghezza d'onda di 490 nm. Inoltre, è stata misurata l'assorbanza di fondo delle piastre multipozzetto a 690 nm ed è stato sottratto questo valore dalla misurazione della lunghezza d'onda primaria (490 nm). Non siamo stati in grado di rilevare alcuna attività LDH nei nostri campioni. L'attività dell'LDH è stata espressa come U/L dell'effluente di perfusione epatica ($1 \text{ U} = \mu\text{mol di INT-formazan min}^{-1}$).

3.3.2. Misurazione di ATP

La misurazione dell'adenosina trifosfato (ATP) (dosaggio CellTiter-Glo® 2.0, Promega) permette di controllare la permeabilizzazione delle membrane delle cellule epatiche e quindi la loro integrità. È stata impiegata la reazione della luciferasi per questo saggio. La generazione di un luminescente ha fornito un segnale proporzionale alla quantità di ATP presente (Synergy H1; BioTek Winooski, VT). Le misurazioni sono state applicate su campioni a flusso continuo nei diversi punti temporali (come per la misurazione LDH descritta sopra) e su tessuto epatico omogeneizzato all'inizio e alla fine dell'esperimento. Abbiamo osservato la diminuzione del contenuto di ATP nel corso degli esperimenti.

3.3.3. Misurazione di albumina-FITC

L'integrità vascolare dei sinusoidi epatici è stata monitorata mediante iniezione di albumina – soluzione FITC nella vena porta. La soluzione di albumina-FITC è stata preparata secondo il protocollo (Barbero, Barolo, e Viscardi, 2016). È stata preparata la soluzione 40 μL BSA - FITC (23 μM) con 80 μL BSA (376 μM) e il volume è stato aggiustato con PBS fino a 400 μL . Questa soluzione (0.2 mL) è stata inoculata nella vena porta. Sono stati raccolti effluenti post-epatici (15 frazioni contenenti ciascuna 0.7 mL). La misurazione è stata eseguita in fluorescenza ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$). La quantità totale di BSA-FITC raccolta in tutte le 15 frazioni è stata calcolata ed espressa come percentuale della quantità iniettata.

3.4. Analisi degli antociani

L'analisi della cianidina 3-glucoside e della peonidina 3-glucoside nell'effluente di perfusione sono state analizzate mediante HPLC-DAD (Vanzo et al. 2008). I campioni (0,1 mL) sono stati miscelati con metanolo (0,1 mL) e mantenuti a -20°C . Al momento dell'analisi, i campioni sono stati acidificati con 1 μL di acido perclorico al 70%, filtrati attraverso un filtro PDVF da 0,22 μ (Millipore Corporation, MA, USA) e direttamente iniettati in una colonna Purospher C18 (250x4,6 mm, 5 μm ; Merck, Darmstadt, Germania) con una precolonna Purospher C18 (4x4

mm, 5 μ m) su un HPLC-DAD 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Il rilevamento e la quantificazione degli antociani sono stati eseguiti utilizzando un metodo leggermente modificato come descritto (Vanzo et al. 2008). La fase mobile era acido perclorico allo 0,3% in acqua Milli-Q (fase A) e metanolo al 100% (fase B). La separazione è stata effettuata a T = 35 °C. Le condizioni del gradiente lineare sono iniziate al 28.5% B, hanno raggiunto il 42% B in 25 minuti; quindi, il 100% B in 1 minuto e sono rimaste al 100% B per 3 minuti. La colonna è stata equilibrata per 6 minuti prima di ogni analisi. La portata era di 0,55 mL min⁻¹ e il volume di iniezione era di 70 μ l. Gli spettri UV-vis sono stati registrati da 200 a 700 nm. L'identificazione dei picchi si è basata sia sui tempi di ritenzione che sugli spettri UV-vis dei composti di riferimento puri. La quantificazione della cianidina 3-glucoside e della peonidina 3-glucoside basata sull'area del picco a 520 nm e le concentrazioni sono state stimate utilizzando il metodo standard esterno.

4. Sintesi e purificazione di HUG: un biorecettore specifico della bilirubina

L'analisi della bilirubina, come descritto precedentemente, nei fluidi biologici è stata eseguita utilizzando un approccio innovativo, che consiste in un biopolimero simile all'elastina, costituito dalla fusione di HELP (Human Elastin Like Polypeptides) e UnaG (Bandiera et al. 2006) utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante.

4.1. Produzione HUG

Nel nostro laboratorio, tramite la tecnologia del DNA ricombinante, è stata creata una nuova proteina di fusione derivante dalla funzionalizzazione del polipeptide biomimetico HELP con il dominio bioattivo UnaG. In questo modo si è sviluppato un biorecettore per la misurazione della UCB che è stato denominato HUG (HELP-UnaG) (Bandiera et al. 2020). Inizialmente, la sequenza del dominio HELP è stata costruita mediante multimerizzazione del gene elastin-like monomero e clonata nel plasmide pQE-8 (Bandiera et al. 2006). Questo vettore codifica una cassetta di resistenza all'ampicillina che consente di clonare un gene in-frame attraverso i siti di restrizione BamHI e HindIII con un tag 6xHis all'N-terminale, dopo un promotore T5 inducibile da IPTG. Il vettore di espressione pHUG, contenente il gene di fusione HUG, è stato ottenuto mediante inserimento in frame della sequenza UnaG al C-terminale della sequenza del gene HELP (Bandiera et al. 2020).

Il protocollo di produzione di HUG comprendeva tre fasi principali: espressione del pHUG in *Escherichia coli*, estrazione del polipeptide prodotto e purificazione della proteina HUG.

4.1.1. Espressione HUG

Il pHUG è stato espresso nel ceppo di *E. coli* C3037 (New England Biolabs). Questi batteri competenti sono stati trasformati secondo le istruzioni del produttore e sono stati selezionati su piastre di agar Luria-Bertani (LB, 10 g di triptone, 5 g di estratto di lievito e 10 g di cloruro di sodio per 1 L). LB agar è stato integrato con ampicillina 50 µg/mL e cloramfenicolo 70 µg/mL. La stessa quantità di antibiotici è stata aggiunta al brodo LB, utilizzato per inoculare quattro singole colonie selezionate sulla piastra. I cloni sono stati espansi in un mezzo liquido selettivo (ampicillina e cloramfenicolo) per lo screening dell'espressione della proteina HUG.

Ogni coltura durante la notte è stata inoculata (1 mL) in 10 mL di brodo LB fresco per testare l'espressione di HUG su scala analitica. La crescita batterica è stata monitorata mediante misurazione della densità ottica (OD) a $\lambda=600$ nm (Jenway 6300). L'intervallo ottimale, per un'adeguata produzione proteica, è 0.8-0.9 OD, raggiunto dopo circa due ore di incubazione nell'agitatore (Shaker 709, Asal) a 37°C. Quando questi valori sono stati raggiunti, i batteri potrebbero essere indotti con 0.001 M di isopropil -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) e incubati per altre quattro ore. Un'aliquota, 400 µL, di campione di coltura è stata raccolta prima dell'induzione e un'altra, 200 µL, della stessa coltura è stata raccolta alla fine della fase di espressione. Entrambe le aliquote sono state centrifugate, a 10000 rpm per 5', e i pellet sono stati risospesi in tampone di caricamento Laemmli (1X) per l'analisi elettroforetica. Dopo il congelamento e lo scongelamento, i campioni sono stati fatti passare alcune volte attraverso un ago da insulina e successivamente incubati nel bagnetto a 100°C per 5'. Quindi, sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di sodio dodecil solfato-poliacrilammide (SDS-PAGE). I campioni sono stati caricati su un gel di acrilammide al 10% e, dopo la separazione elettroforetica, le bande proteiche sono state visualizzate mediante colorazione con blu di Coomassie. La comparsa della banda HUG nel campione indotto ha confermato l'efficace espressione della proteina ricombinante e il clone è stato successivamente utilizzato per la produzione della proteina HUG su scala preparativa.

Una coltura starter è stata preparata dal clone selezionato, in un volume totale di 150 mL di brodo LB, addizionato sia di ampicillina (50 µg/mL) che di cloramfenicolo (70 µg/mL). Dopo la sua incubazione notturna a 37 ° C nell'agitatore, la coltura è stata espansa in terreno Terrific

Broth (TB, 12 g di triptone, 24 g di estratto di lievito bacto per 1 L a pH 7.2), un brodo microbico ricco di nutrienti per la coltivazione non selettiva. Questo mezzo è stato aggiunto con tampone glicerolo-fosfato (PGB, 6.93 g di fosfato di potassio monobasico, 37.7 g di fosfato di potassio dibasico e 12.5 g di glicerolo per 300 ml). Alla coltura starter è stato aggiunto un volume totale di 1.2 L di terreno, equamente suddiviso in tre beute, che sono state incubate a 37°C nell'agitatore. L'induzione colturale è stata implementata come descritto sopra. Dopo due o tre ore ed è stato raggiunto l'intervallo di DO corretto di 0,8-0,9 DO, la coltura preparativa è stata indotta aggiungendo 0,001 M IPTG in ciascuna beuta. Dopo cinque ore di incubazione, la coltura batterica è stata centrifugata a 8000 rpm a 8°C per 20' (J-26 XP, Beckman Coulter). I pellet ottenuti sono stati risospesi nel tampone di estrazione (50 mM Tris/HCl pH 8, 250 mM NaCl, 0.1 mM acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), 0.1% v/v Triton X-100) e conservati a -20°C.

4.1.2. Estrazione HUG

L'intera procedura di estrazione è stata eseguita in ghiaccio. I pellet scongelati sono stati aggiunti con un tampone di estrazione contenente 0,1 mM di fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF). Il campione è stato omogeneizzato (OV5, Velp Scientifica) tre volte, ciascuna della durata di 1' con intervalli di 1'. Quindi, i campioni sono stati sottoposti a un'altra fase di interruzione ad alta pressione (Panda NS1001L, GEA Niro Soavi). Questa preparazione è stata fatta passare attraverso questo apparato ad una pressione di circa 1300 bar per 4 volte. La soluzione è stata raffreddata, aggiunta di 500 µl di β-mercaptoetanololo e centrifugata (Avanti J-26 XP Beckman Coulter) a 10000 rpm a 8°C per 30'. Il surnatante è stato immediatamente purificato o conservato a -20°C.

I pellet di due colture batteriche di 1.2 L ciascuna sono stati combinati, omogeneizzati e disgregati in un volume totale di 400 mL di tampone di estrazione. Dopo questi processi, la sospensione è stata portata fino a 700 mL con tampone di estrazione, centrifugata e, infine, il surnatante è stato suddiviso in tre bottiglie di uguale volume (circa 240 mL).

4.1.3. Purificazione HUG

Il surnatante derivato dall'estrazione HUG (circa 240 mL) è stato addizionato con cloruro di sodio 5M (NaCl) (0.5 vol) ed è stato precipitato a 42°C per 10 minuti. Quindi, è stato centrifugato a 10000 rpm a 38°C per 30'. Il pellet è stato risospeso in circa 25 mL di una

soluzione contenente taurocolato di sodio 0.1 mM e Tween-20 allo 0,05% v/v, raffreddato su ghiaccio e centrifugato a 10000 rpm a 8°C (5804R, Eppendorf) per 10'. Il surnatante (1 vol) è stato recuperato e nuovamente precipitato aggiungendo 5M NaCl (0.5 vol) e riscaldato a 42°C per 10' per provocare la transizione in fase solida di HUG. Il pellet di questo materiale è stato ottenuto mediante centrifugazione a 8500 rpm a 38°C per 20'. È stato risospeso con circa 20 mL di acqua fredda milliQ, congelato e liofilizzato (Edwards).

Lo schema seguente riassume l'intera procedura di purificazione (figura 21):

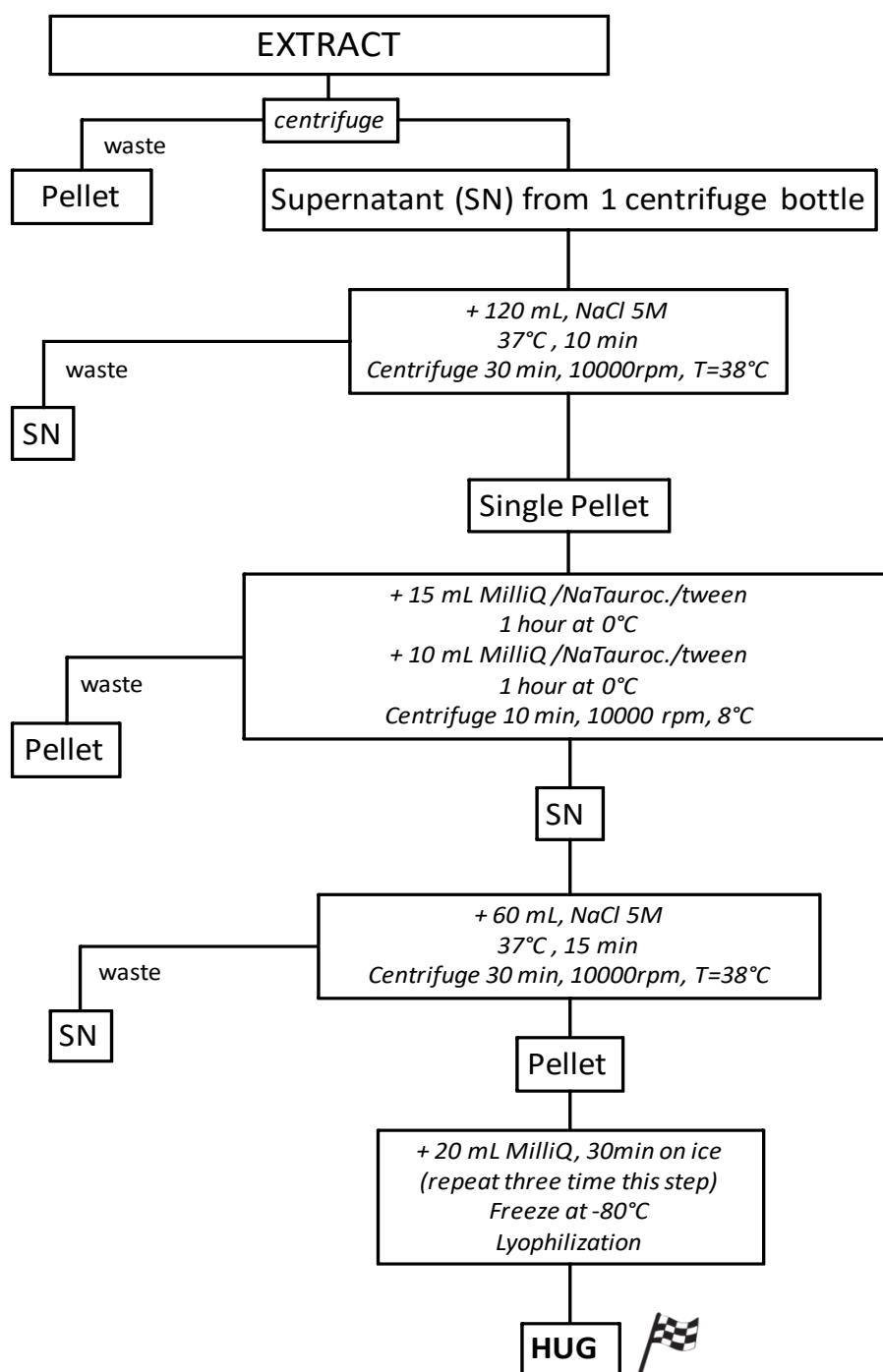


Figura 21. Rappresentazione schematica della fase di purificazione della proteina di fusione *HELP - UnaG (HUG)*.

5. Controlli di qualità

5.1. Controllo della struttura HUG

Per prima cosa è stata preparata una soluzione di 2 mg/mL, pesando il prodotto liofilizzato e sciogliendolo in acqua fredda. Essa è stata analizzata mediante spettrofotometria (Cary 4E, Varian) a $\lambda=250-350$ nm, identificando il valore di assorbanza a $\lambda=280$, che è indicativo della capacità degli amminoacidi aromatici di assorbire la luce ed è specifico solamente per la sequenza di UnaG. La stessa soluzione è stata analizzata su un gel SDS-PAGE al 10%, visualizzato mediante colorazione con blu di Coomassie.

5.1.1. Controllo della funzione HUG

La stessa soluzione di 2 mg/mL è stata utilizzata per ottenere il suo spettro di eccitazione ed emissione in fluorescenza mediante l'ausilio di un lettore di micropiastre (Synergy H1, BioTeck). Un campione di HUG (2 mg/mL, 10 μ L) è stato inserito in un pozzetto di una piastra da 96 pozzetti e addizionato di bilirubina (Sigma, 100 nM, 200 μ L). Lo spettro di eccitazione è stato registrato nell'intervallo $\lambda=400-520$ nm, ad emissione costante $\lambda=550$ nm. Quindi, viceversa, lo spettro di emissione è stato registrato nell'intervallo $\lambda=510-600$ nm, ad eccitazione costante $\lambda=470$ nm (figura 22).

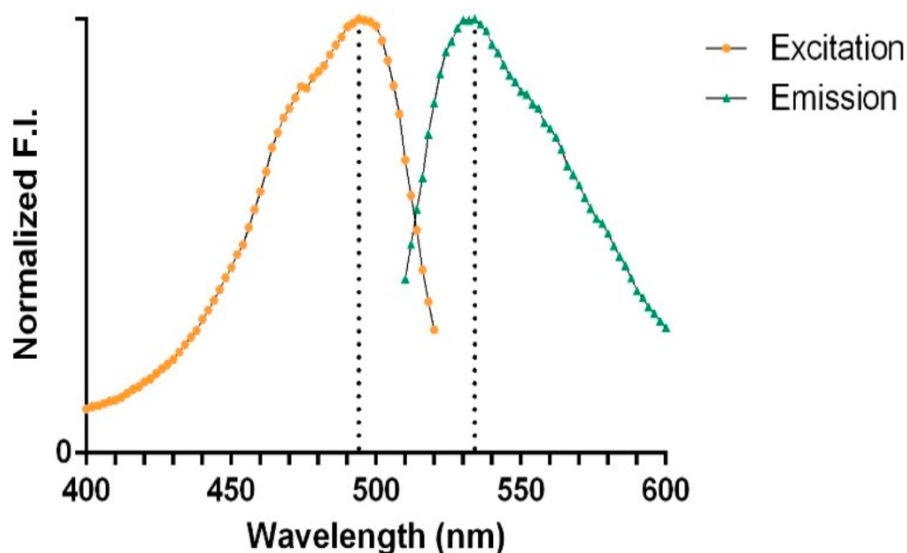


Figura 22. Spettro di HUG di eccitazione ed emissione in fluorescenza.

5.2. Prova di attività di legame del biorecettore HUG con la bilirubina

Per verificare che la proteina di fusione HUG purificata conservi la capacità di legare la bilirubina si effettua l'analisi della fluorescenza mediante l'utilizzo di una retta di calibrazione con concentrazioni note.

5.2.1. Preparazione della soluzione stock

La soluzione stock 5 mM è stata preparata sciogliendo 3 mg di bilirubina in 1 mL di dimetilsolfossido al 100% (DMSO). Questa soluzione è stata preparata al buio. Le aliquote possono essere conservate a -20 °C per un mese.

5.2.2. Preparazione della soluzione di lavoro

La soluzione stock è stata diluita con una soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), arricchita di DMSO allo 1:0.03, vol/vol a pH 7.4 (PBSD), per preparare la bilirubina 10 μ M (soluzione di lavoro), conservata in flaconi marroni. Questa soluzione è stata analizzata mediante spettroscopia UV-VIS per ottenere lo spettro a $\lambda = 350-600$ nm con cuvette in quarzo o polistirene.

5.2.3. Dosaggio della bilirubina: preparazione della soluzione di HUG

Una soluzione di 2 mg/mL di HUG è stata ottenuta sciogliendo 2mg di polimero liofilizzato in 1 mL di acqua fredda e mantenendolo in ghiaccio, per favorirne la solubilizzazione. Successivamente quest'ultima soluzione è stata diluita in PBS per ottenerne una di lavoro alla concentrazione di 0.4 mg/mL (400 μ L di HUG 2 mg/mL in 1600 μ L di PBS pH 7,4).

5.2.4. Preparazione delle soluzioni standard di bilirubina

Le soluzioni standard di bilirubina sono state ottenute diluendo la soluzione di lavoro a diverse concentrazioni finali (range 0-50 nM). Queste soluzioni sono state preparate in flaconi marroni per evitare il rischio di degradazione della bilirubina per esposizione alla luce. Le soluzioni standard sono state preparate sempre in PBSD 99.7:0.3, vol/vol.

6. Curva di calibrazione

La fluorescenza correlata alla bilirubina è stata calibrata consentendo ad HUG (0,4 mg/mL; 10 µL) di legare la bilirubina a concentrazioni note, nell'intervallo 0-50 nM. La fluorescenza è stata registrata a $\lambda_{ex} = 485$ nm e $\lambda_{em} = 528$ nm (Synergy H1; BioTek Winooski, VT).

I dati di fluorescenza sono stati tracciati contro le concentrazioni di bilirubina, per ottenere una curva di calibrazione. I dati sono stati adattati mediante analisi di regressione lineare, per derivare i parametri della curva. Il limite di rilevamento (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati in base all'equazione seguente, dove SE è l'errore standard della regressione:

$$LOD = \frac{3 * SE}{\text{slope of regression}}$$

$$LOQ = \frac{10 * SE}{\text{slope of regression}}$$

6.1. Configurazione del saggio

Il saggio biologico di fluorescenza HUG in mezzo liquido è stato eseguito in micropiastre di polistirene nero a 96 pozzetti.

La configurazione che è stata utilizzata è HUG 0,4 mg/mL (aggiunti 10 µL di questa soluzione nella piastra da 96 pozzetti) con 200 µL di standard di bilirubina da 0-50 nM. Lasciata incubare a 25°C per un'ora.

6.1.1. Calcolo della concentrazione di bilirubina nell'effluente del fegato isolato e perfuso

I test di assorbimento sinusoidale sono stati effettuati quando l'effluente era completamente limpido e il fegato era completamente passato da rosso-marrone a giallo-marrone.

Sono stati iniettati boli di 200 µL dei diversi composti presi in esame, disciolti in PBS:DMSO, 80:20, vol/vol (PBSD), utilizzando una siringa da 1 mL collegata alla porta della cannula della vena porta. Dopo ogni bolo, sono stati raccolti in tubi di plastica dieci frazioni di flusso di ca.

350-400 μL ciascuno, in un intervallo di tempo di ca. 40 secondi. Poi, è stato effettuato un lavaggio non inferiore a 40 secondi tra un bolo ed il successivo.

Infine, sono stati prelevati 200 μL di ciascuna frazione e sono stati trasferiti in una piastra nera a 96 pozzetti già ricoperta con 10 μL di HUG (0.4 mg/mL; 6.62 μM , 66.2 pmoli). Le concentrazioni di BR utilizzate sono descritte in tabella 4. Lasciata ad incubare per un ora a 25°C e letta la fluorescenza.

BR STD #	[BR] (nM)	10 μM BR (μL)	PBS-D (μL)
0	0	0	5000
1	10	5	4990
2	20	10	4980
3	25	12.5	4987.5
4	30	15	4985
5	50	25	4975

Tabella 4. Concentrazioni (nM) e volumi (μL) utilizzati per le soluzioni standard di BR.

Per stimare la concentrazione di bilirubina presente nell'effluente del fegato isolato e perfuso è stata utilizzata un'analisi della regressione dei valori di fluorescenza ottenuti dalle soluzioni standard di bilirubina, compresi tra 0 e 50 nM. Considerando l'equazione lineare canonica come rappresentativa della retta di regressione ottenuta dall'analisi di regressione, la concentrazione di bilirubina nel campione è stata calcolata dalla seguente equazione (figura 26):

$$C_{sample} = \frac{[(F.U._{sample} - F.U._{blank}) - q]}{m} * dilution\ factor$$

dove F.U. è l'intensità di fluorescenza misurata dal lettore di fluorescenza. Il bianco è considerato come la misura della fluorescenza intrinseca del campione in assenza di HUG. La concentrazione finale del campione è correlata alla specifica diluizione eseguita.

6.1.2. Preparazione delle soluzioni di bilirubina e degli inibitori utilizzati

Vengono preparate, come di seguito indicato, delle soluzioni stock di BR e altri composti (in polvere) in DMSO, che possono essere conservate per non più di 1 mese a -20°C:

- BR (5 mM)
- E17G, indometacina e ketoprofene (50 mM)
- C3G (100 mM)
- Pravastatina (300 mM)
- Usare PBS:DMSO (80:20, vol/vol; (Thackaberry et al. 2014)) come veicolo per BR e per tutti i composti.

Queste soluzioni concentrate ed aliquotate, verranno diluite di volta in volta a 1 mL secondo lo schema seguente (tabella 5), per ottenere uno qualsiasi dei 3 tipi di bolo con la composizione adatta all'iniezione intraportale:

Tipo di bolo	Concentrazione soluzione (μL)		Solvente (μL)	
	BR	Composto	DMSO	DMSO:PBS (17.5:100, vol/vol)
BR sola	10	0	20	970
BR + Composto	10	20	0	970
Composto solo	0	20	10	970

Tabella 5. Volumi (μL) utilizzati per le soluzioni di BR e per i rispettivi inibitori utilizzati.

Sini stati diluiti 10 μL di queste soluzioni concentrate in 5 mL di BR standard come nella tabella 6, per ottenere una soluzione standard BR contenente 0.1 mM E17G o Indometacina o Ketoprofene, 0.2 mM C3G e 0.6 mM Pravastatina.

È fondamentale che questi boli misti siano preparati il più vicino possibile al momento dell'iniezione, per evitare possibili reazioni chimiche (ad es. trasferimento di elettroni) o interazioni (ad es. aggregazione o complessazione) tra BR ed i composti.

BR STD #	[BR] (nM)	10 μ M BR (μ L)	Concentrazione composto (μ L)	PBS-D (μ L)
0	0	0	10	4990
1	10	5	10	4985
2	20	10	10	4980
3	25	12.5	10	4977.5
4	30	15	10	4975
5	50	25	10	4965

Tabella 6. Concentrazioni (nM) e volumi (μ L) utilizzati per le soluzioni standard di BR e per i rispettivi inibitori utilizzati per verificare le possibili interferenze di quest'ultimi con il saggio BR+HUG.

6.3. Analisi della bilirubina e bilirubina glucuronide nel sangue di ratto

6.3.1. Prelievo sangue di ratto

Sono stati prelevati dalla coda anche dei campioni di sangue dalle stesse ratte Wistar femmine (autorizzazione progetto 3379PAS18, aut. N. 65/2019 – PR del Ministero della salute dd. 28.01.2019). I prelievi, aliquote di 10 μ L sono state aggiunte direttamente a 1 mL di PBS contenente 0,1 mg/mL di HUG.

6.3.2. Analisi della bilirubina nel sangue intero, nel plasma e siero

Il sangue intero è stato analizzato mediante il test di fluorescenza HUG: le aliquote (10 μ L) sono state miscelate con HUG (0.1 mg/mL, 1 mL), vortexate per circa 1' e centrifugate a 13000 rpm per 0.5'. Il surnatante (800 μ L) è stato suddiviso in 4 pozzetti, per la registrazione della fluorescenza replicata. Nei campioni di sangue intero, l'ematocrito è calcolato grazie all'utilizzo della camera di conteggio Thoma, dove sono stati introdotti 10 μ L di sangue diluite 1:200 in PBS. L'ematocrito è stato stimato calcolando il numero medio di globuli rossi (RBC) contati in 16 quadratini, con un volume di 0,00025 mm³ ciascuno, applicando la seguente equazione:

$$HTC (\%) = RBC \text{ count } \left(\frac{\text{millions}}{\mu L} \right) * MCV (fL) * 0.1$$

dove HTC è l'ematocrito e MCV è il volume corpuscolare medio, cioè il volume medio occupato dai globuli rossi.

Inoltre, sono stati raccolti circa 600 µL di sangue intero dalla coda del ratto per poi produrre il siero. È stato mantenuto a temperatura ambiente per un'ora in modo da consentire la coagulazione del sangue, poi è stato centrifugato a 10000 rpm per 10' e quindi il surnatante è stato centrifugato ancora una volta a 5000 rpm per 5' per eliminare i globuli rossi residui.

Dallo stesso ratto è stato prelevato anche il plasma, dopo aver somministrato eparina (0,1 U) per via intracardiaca mediante puntura cardiaca trans-toracica. Sono stati raccolti circa 600 µL di sangue intero eparinizzato, centrifugato una prima volta a 10000 rpm per 10' ed una seconda volta a 5000 rpm per 5' per rimuovere eventuali globuli rossi residui.

6.3.3. Analisi della bilirubina glucuronide nel sangue intero, nel plasma e siero

Negli stessi campioni precedentemente analizzati per la bilirubina, è stata analizzata la bilirubina glucuronide, aggiungendo l'enzima β -glucuronidasi e registrando l'ulteriore fluorescenza correlata all'idrolisi della bilirubina glucuronide. L'enzima β -glucuronidasi (Sigma Aldrich), è costituito da una soluzione contenente 35 unità/µL in tampone fosfato pH 6,8 ed è stato diluito direttamente nella piastra multipozzetto alla concentrazione di 1 unità/pozzetto. I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per almeno due ore e quindi è letta la fluorescenza.

6.3.4. Analisi della biliverdina nel siero di orata

Per l'analisi della biliverdina sono stati utilizzati 6 campioni di siero congelato di orata forniti dalla dott.ssa Ivona Mladineo, Istituto per l'oceanografia e la pesca, Spalato, Croazia, nell'ambito del progetto AdriaAquaNet. È stato possibile analizzare la biliverdina convertendola in bilirubina in presenza di HUG, biliverdina reduttasi e il suo co-substrato NADPH + H⁺. Il sistema di reazione a 2 fasi provoca la conversione irreversibile della biliverdina in un complesso bilirubina-HUG, a condizione che sia il co-substrato che l'HUG siano in eccesso.

Per prima cosa sono state preparate soluzioni di biliverdina (Sigma). La soluzione madre, 50 nM in DMSO, è stata diluita a soluzioni ottenute a concentrazioni comprese tra 0-100 nM in

PBS pH 8.5 contenente 0.4 g/L di BSA. Ad HUG (600 μ L di una soluzione da 0.1 mg/mL) sono state aggiunte 53 μ L di campione o soluzione standard. Quindi, queste miscele sono state integrate con l'enzima biliverdina reductasi (15 μ L, preparato in PBS pH 8.5, in modo da fornire 0.075 unità/pozzetto) e 2.7 mM di β -Nicotinammide adenina dinucleotide 2'-fosfato ridotto (NADPH, Sigma, 150 μ L) in PBS pH 8.5. Sia i campioni che la miscela di standard sono stati incubati a 37°C per 3 ore e quindi portati a 4°C per un'altra ora. Dopo un'altra mezz'ora a temperatura ambiente, è stata registrata la fluorescenza.

7. Analisi statistiche

Tutti i dati sono stati analizzati e tracciati utilizzando GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Softwares). Per analizzare le possibili differenze tra le diverse curve, è stata calcolata l'AUC. Lo stesso software è stato utilizzato per calcolare Tmax, Cmax, mediana, media e DS del set di dati. Le curve di calibrazione sono state ottenute adattando i dati mediante analisi di regressione, ottenendo i coefficienti della curva, utilizzati per convertire le unità di fluorescenza in concentrazione di bilirubina, e il coefficiente di determinazione (R^2). La differenza tra le medie è stata analizzata mediante il t-test non accoppiato.

Risultati

1. Analisi della bilirubina frazionata in soluzioni fisiologiche

La novità di questo studio, come descritto precedentemente, è stata principalmente l'utilizzo della proteina sintetica HUG, un biosensore per il rilevamento e la quantificazione della bilirubina non coniugata (Bandiera et al. 2020). Questo polipeptide è caratterizzato da due diverse frazioni, HELP ed UnaG, ciascuna con una specifica funzione. La frazione HELP grazie alla sua capacità di compiere transizione di fase inversa può facilitare la purificazione delle proteine e può determinare la formazione di matrici mediante reazioni di reticolazione intercatena, consentendo il rilevamento della bilirubina anche in mezzi complessi. UnaG è responsabile del legame specifico con la bilirubina e della successiva emissione del segnale di fluorescenza. In questo progetto di tesi verranno utilizzati due lotti di HUG, dopo essere stati caratterizzati, per l'analisi della bilirubina in soluzioni fisiologiche.

1.1. Caratterizzazione dei lotti di HUG

Per verificare l'integrità dei lotti di polimero, dopo essere stati liofilizzati, aliquote di entrambi i lotti (30 mg ciascuno circa) sono state sciolte in acqua ultrapura a 2 mg/mL. Il contenuto proteico è stato determinato gravimetricamente (esempio di HUG liofilizzato figura 23).

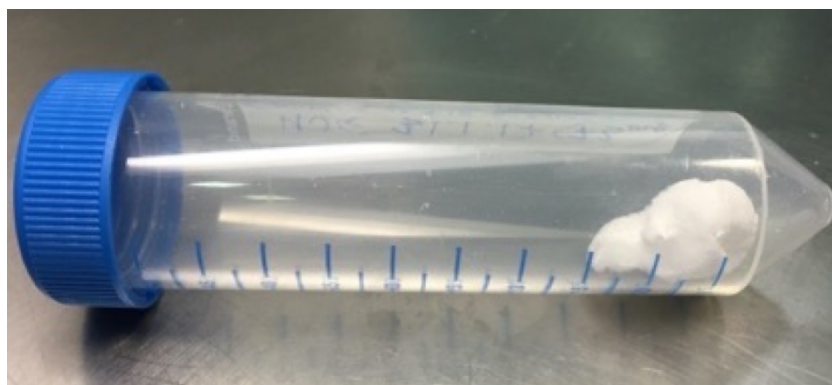


Figura 23. Preparato HUG liofilizzato puro (circa 30 mg).

Ciascun lotto è stato caratterizzato da SDS-PAGE (figura 24). HELP è stato usato come controllo; sono state caricate sul gel anche diverse quantità di proteina HUG, utilizzandola come riferimento interno per l'analisi dei lotti prodotti (figura 24B). La mobilità elettroforetica della banda principale di ciascun HUG, utilizzato come standard interno, era di circa 60 kDa.

Poiché la mobilità elettroforetica di HELP (MW calcolato 44886 Da) analizzata da SDS-PAGE corrispondeva ad un peso molecolare apparente di circa 50 kDa, è ipotizzabile che la banda a 60 kDa rappresenti la molecola HUG a lunghezza intera (MW calcolato 60406 Da). Sono presenti anche altre deboli bande, che corrispondono a prodotti di degradazione della proteina, un fenomeno noto ma non del tutto caratterizzato che però non può essere evitato (Schipperus et al. 2009). Tuttavia, questa degradazione rappresenta non più del 20% della quantità totale di proteine contenute nel campione.

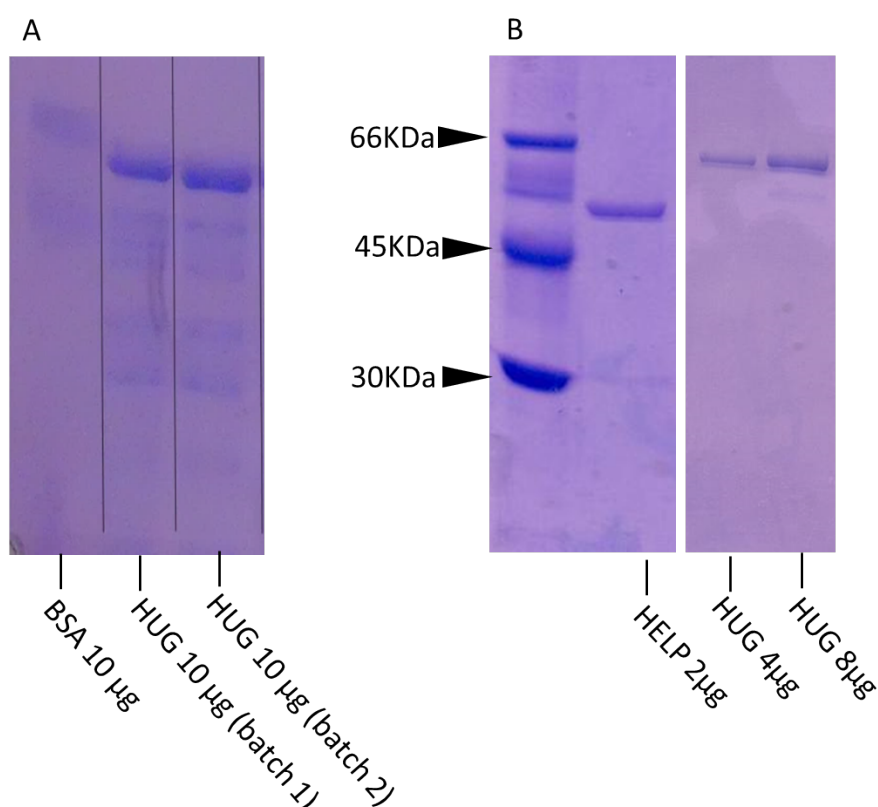


Figura 24. SDS-PAGE di preparazioni HUG colorate con blue di Coomassie. Due lotti di HUG (pannello A) sono stati separati su gel di poliacrilammide al 10%. Per riferimento, viene presentata una preparazione di benchmark interna sia di HUG che del suo scaffold HELP nudo (pannello B).

Entrambi i lotti sono stati combinati in un unico lotto (60 mg) e ulteriormente caratterizzati mediante spettroscopia UV-visibile (figura 25).

È stato acquisito il picco acquisito tipico della frazione UnaG della proteina, che contiene amminoacidi aromatici, in grado di assorbire la luce UV in un intervallo specifico dello spettro

UV-Vis. Secondo la legge di Lambert-Beer, $A_{\max}$ a $\lambda = 280$ nm è direttamente proporzionale alla concentrazione della proteina nella soluzione analizzata. Il coefficiente di estinzione molare (ϵ) della proteina HUG è stato calcolato in modo da corrispondere a $19540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, considerando i diversi amminoacidi aromatici presenti nella sua struttura primaria. Questo coefficiente ha permesso di calcolare direttamente la concentrazione di HUG mediante l'assorbanza a 280 misurata nella soluzione.

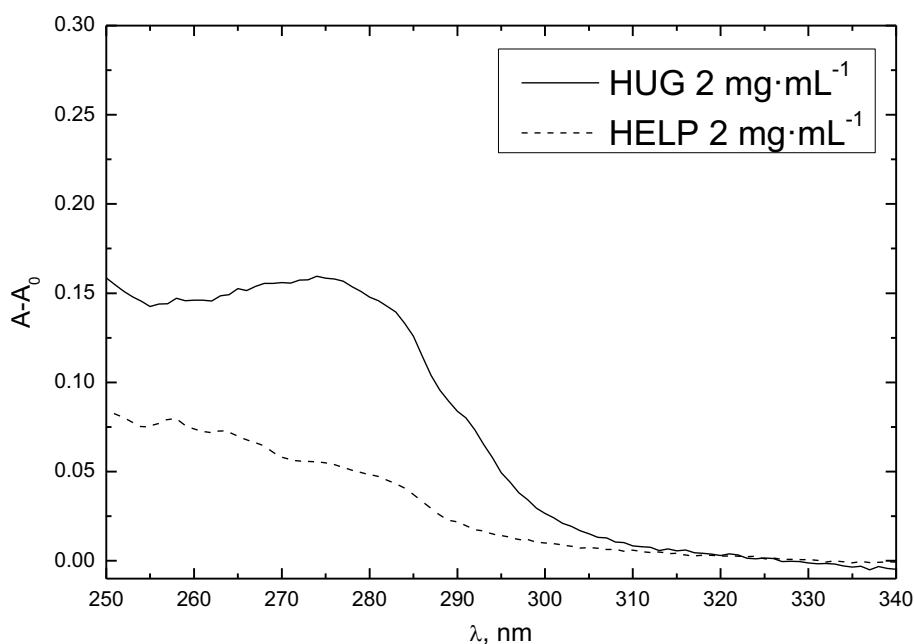


Figura 25. Spettri di assorbimento di HUG (linea) e HELP (linea tratteggiata), disciolti in acqua ultrapura (A_0), registrati in cuvetta di quarzo ($d=1$ cm) (spettrofotometro Cary).

1.2. Curva di calibrazione BR

Successivamente aliquote di ciascun lotto HUG ($10 \mu\text{L}$, 0.4 mg/mL in PBS) sono state aggiunte a una piastra a 96 pozzetti, contenente soluzioni standard di bilirubina da $200 \mu\text{L}$ in PBS,

pH 7.4, e sono state lasciate a formare il complesso HUG-bilirubina a temperatura ambiente per 1 ora (come descritto ampiamente in materiali e metodi paragrafo 5.2. e successivi). La fluorescenza è stata registrata ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$) per ciascun lotto HUG. I dati rappresentati sono l'insieme di 40 rette indipendenti ottenute dai due lotti di HUG caratterizzati, mediati e con le rispettive deviazioni standard nell'intervallo di valori 0-50 nM (figura 26). I dati medi sono stati adattati mediante analisi di regressione lineare.

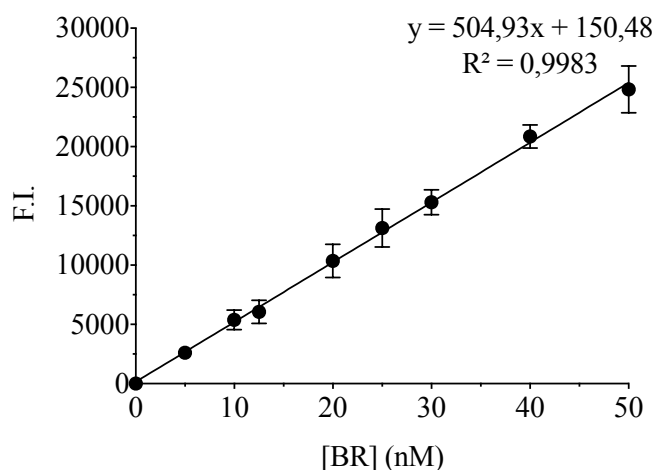


Figura 26. Retta standard di bilirubina. Adattamento di regressione dei valori di fluorescenza ottenuti da soluzioni standard di bilirubina in PBS (y = 504.93 x - 150.48; R² = 0.9983; LoD = 0.74 nM, LoQ = 2.25 nM).

1.3. Analisi della bilirubina glucuronide nell'effluente del fegato isolato e perfuso

In questo studio è stato necessario anche analizzare la stabilità dell'enzima β -glucuronidasi nel tempo, in modo da verificare se la fluorescenza di bilirubina glucuronide registrata fosse una stima corretta della massima fluorescenza emessa dalla reazione di glucuronidazione.

La bilirubina glucuronide è stata analizzata negli stessi campioni precedentemente analizzati per la bilirubina, aggiungendo ai campioni l'enzima β -glucuronidasi e registrando l'ulteriore fluorescenza correlata alla bilirubina risultante dall'idrolisi della bilirubina glucuronide. L'enzima commerciale β -glucuronidasi (Sigma Aldrich), costituito da una soluzione contenente 35 unità / μ L in tampone fosfato pH 6.8, è stato diluito direttamente nei campioni della piastra multipozzetto, alla concentrazione di 8 unità/pozzetto (1 unità trasforma 20 nmoli all'ora; quindi, è stato utilizzato un eccesso di β -glucuronidasi per ogni campione analizzato, in modo da essere sicuri che la reazione enzimatica avvenisse). La fluorescenza è stata registrata ogni ora per le prime due ore, poi i campioni sono stati incubati a 4°C per 24 ore e quindi dopo aver riportato la piastra a 25°C, è stata registrata nuovamente la fluorescenza ogni due ore (figura 27). Il time course della β -glucuronidasi suggerisce che la massima fluorescenza si ottiene dopo le 24 ore, rimanendo pressoché invariata per le successive 6 ore.

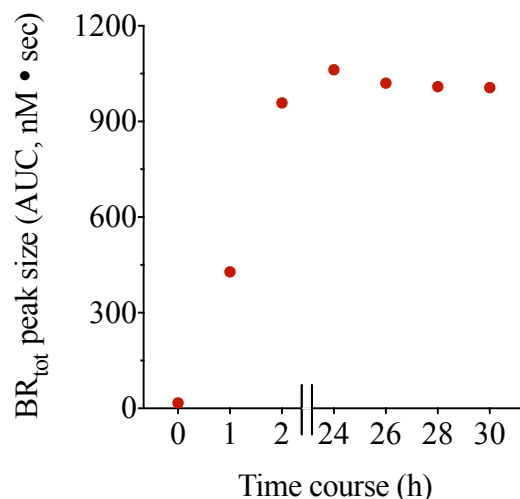


Figura 27. Time course della β -glucuronidasi. Analisi dell'AUC della bilirubina glucuronide a diversi tempi, dopo inoculo di un bolo di BR+E17G in PBS 80:20, vol/vol.

1.4. Analisi delle interferenze del saggio con HUG

Inoltre, è necessario valutare le possibili interferenze nel saggio fluorometrico con HUG, quando si utilizzano dei composti in associazione con BR tramite bolo intraportale oppure in prove di uptake cellulare in vitro.

Sono stati testati i composti a 1/10 della loro concentrazione nel bolo, per tener conto della loro diluizione nei sinusoidi (secondo lo schema proposto nella sezione materiali e metodi, paragrafo 6.1.2). I dati relativi all'interferenza per ogni inibitore utilizzato sono riportati in figura 28, dal grafico si osserva che i dati relativi alla fluorescenza della bilirubina in presenza o in assenza degli inibitori sono i medesimi. Questo suggerisce che i composti testati non interferiscono nel saggio fluorimetrico con HUG.

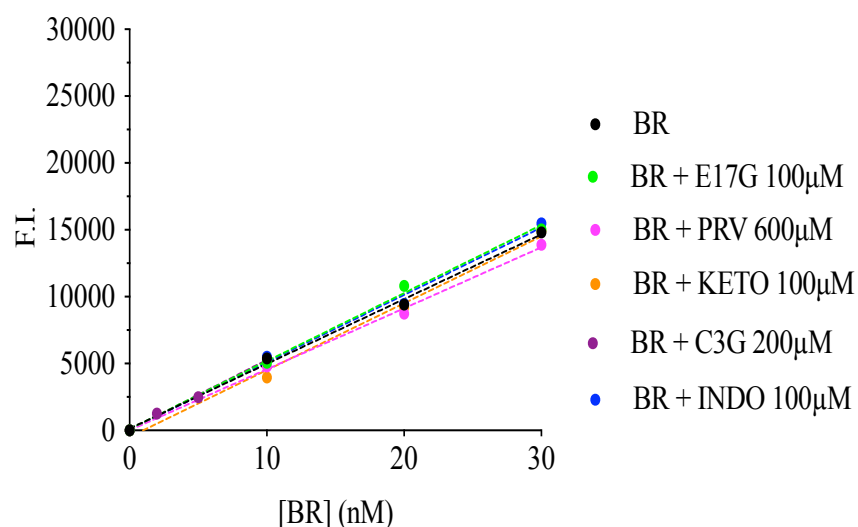


Figura 28. Test di interferenza. L'HUG è stato autorizzato a legare la bilirubina in presenza di 0.1 mM E17G o indometacina o ketoprofene, 0.2 mM C3G e 0.6 mM Pravastatina

2. Uptake della bilirubina nella linea cellulare SH-SY5Y

Dopo aver ottenuto ottimi risultati in vitro, abbiamo iniziato a studiare l'assorbimento della bilirubina nella linea cellulare SH-SY5Y.

Per svolgere questo esperimento è stato sostituito il terreno di coltura cellulare con il PBS contenente bilirubina 30 nM e una piccola quantità di albumina sierica bovina (BSA; un decimo del suo valore fisiologico nel sangue). Sono stati prelevati a tempi diversi quantità costanti dal mezzo extracellulare e misurata la concentrazione di bilirubina mediante il test HUG (HUG in liquido). Da questi dati è stato possibile calcolare la quantità di bilirubina assorbita nelle cellule. Il test è stato eseguito anche in presenza di 10 µM C3G, utilizzato come inibitore specifico per il trasporto della bilirubina attraverso la bilitranslocasi (Sabina Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002).

I dati in figura 29 mostrano che queste cellule sono in grado di assorbire la bilirubina, ma si può osservare anche che questo effetto è parzialmente inibito da C3G in tutti i momenti esaminati. A causa dell'elevata variabilità dei dati, che sono il prodotto di tre diversi esperimenti di coltura cellulare, non è stata raggiunta la significatività statistica della differenza.

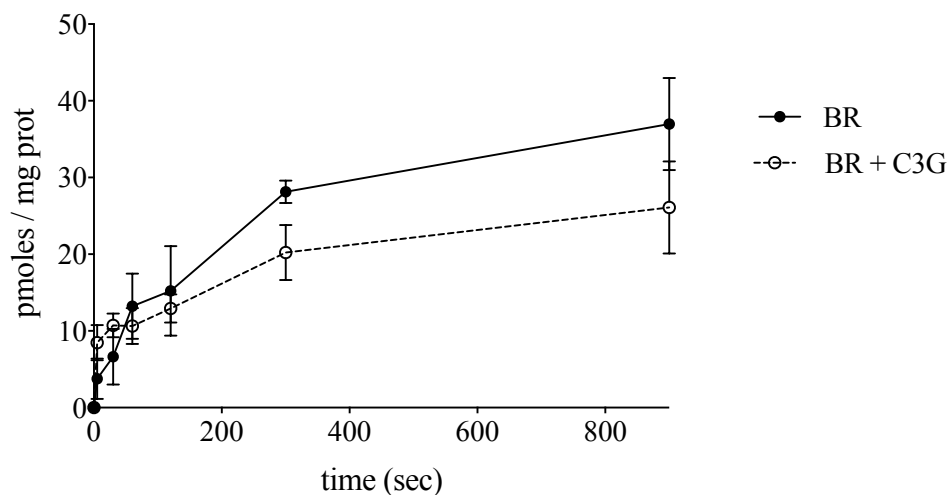


Figura 29. Media dell'assorbimento della bilirubina nelle cellule SH-SY5Y in tre diversi esperimenti. I dati vengono espressi come pmoli di bilirubina, normalizzati per la quantità di proteine versus il tempo in secondi. Non è stata osservata nessuna significatività statistica.

Questo risultato indica che anche nella linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y esiste un meccanismo di trasporto della bilirubina, che almeno in parte dipende dall'attività di un trasportatore di membrana.

2.1. Uptake della bilirubina nella linea cellulare HepG2

Lo stesso tipo di esperimento è stato effettuato nelle cellule HepG2, anche in questo caso nonostante l'elevata variabilità del modello sperimentale utilizzato, si osserva che almeno in parte il trasporto della bilirubina viene modulato da un trasportatore di membrana, che potrebbe coincidere con la bilitranslocasi.

I dati in figura 30 mostrano che anche in questo caso le cellule sono in grado di assorbire la bilirubina, ma questo effetto è parzialmente inibito da C3G in tutti i momenti esaminati. Nonostante ciò, non è stata raggiunta la significatività statistica delle differenze nella media di tre differenti esperimenti utilizzati.

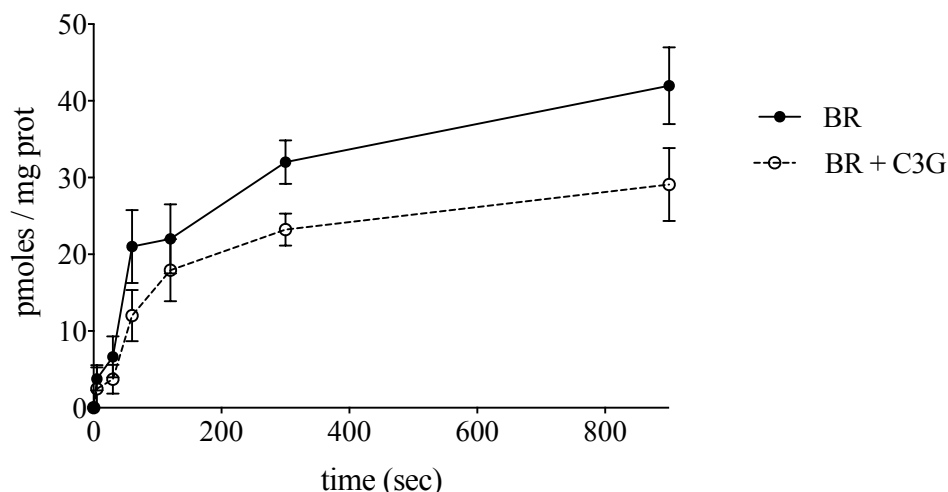


Figura 30. Media dell'assorbimento della bilirubina nelle cellule HepG2 in tre diversi esperimenti. I dati vengono espressi come pmoli di bilirubina, normalizzati per la quantità di proteine versus il tempo in secondi. Non è stata osservata nessuna significatività statistica.

3. Il trasporto della bilirubina nel fegato isolato e perfuso

Per meglio comprendere i meccanismi molecolari del trasporto epatico della bilirubina a livello del dominio basolaterale (sinusoidale) dell'epatocita, è stato utilizzato come modello sperimentale il fegato isolato e perfuso, dato che vengono preservati i complessi processi di trasporto epatobiliare dell'architettura epatica (Stieger, Mahdi, e Jäger 2017). È stato realizzato secondo un approccio standard (Bessems et al. 2006), come mezzo di perfusione è stata utilizzata una soluzione priva di albumina sierica, in modo da evitare qualsiasi complicazione causata dagli equilibri BR-albumina variabili. Inoltre, la perfusione è stata eseguita in mancanza di aggiunta di ossigeno, per prevenire la formazione di radicali liberi dell'ossigeno e di reazioni redox che coinvolgono la bilirubina (Asad et al. 2001), gli antociani (Yamasaki, Uefuji, e Sakihama 1996), i fosfolipidi di membrana e altri componenti cellulari. Inoltre, dato che l'esperimento si esaurisce in circa 25 minuti, anche se si fosse causata un'ischemia a breve termine, questa non avrebbe avuto alcun impatto sull'integrità strutturale (González-Flecha, Cutrin, e Boveris 1993) e metabolica dell'organo (T. S. Chan et al. 2018). Tuttavia, il nostro protocollo ha fornito una perfusione costante di substrati per la sintesi di ATP, come glucosio 2.5 mM, piruvato 2 mM e lattato 0.2 mM, determinando un rapporto molare di piruvato : lattato (10 : 1) costante ed in equilibrio con il citosol degli epatociti, grazie ai trasportatori monocarbossilati 1 o 2 (MCT1/SLC16A1; MCT2/SLC16A7) (Bonen, Heynen, e Hatta 2006). Quindi, il piruvato potrebbe accettare equivalenti riducenti nella reazione della lattato

deidrogenasi, garantendo un'alta disponibilità di NAD⁺, che potrebbe essere utilizzato sia nella glicolisi che nel ciclo dell'acido citrico come anche nelle rispettive reazioni di fosforilazione a livello di substrato, limitando così possibili danni metabolici. Abbiamo verificato queste ipotesi monitorando l'effluente della perfusione epatica per marker di permeabilizzazione di membrana (ATP), citolisi (LDH) (figura 31A) e integrità vascolare (BSA-FITC) (figura 31B).

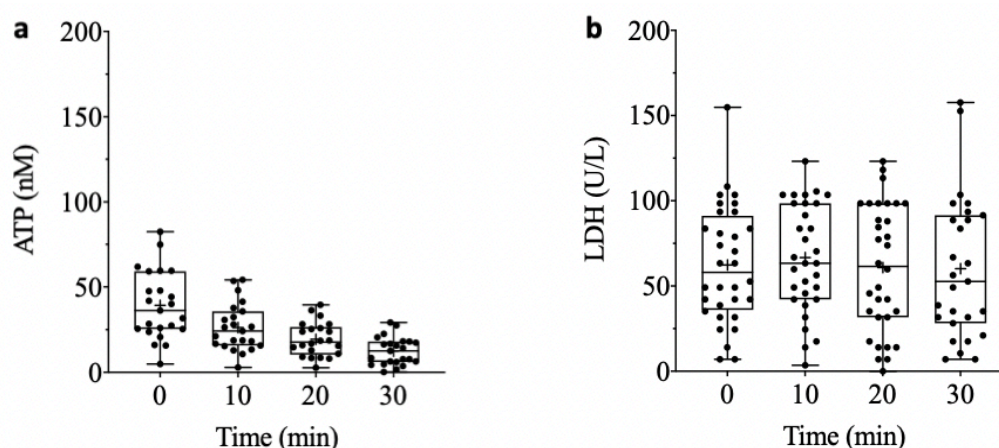


Figura 31A. Analisi di ATP e LDH nell'effluente venoso epatico di fegati di ratto perfusi isolati. Box plot delle concentrazioni di ATP (a) e dell'attività di LDH (b) rilevate in 4 frazioni inter-boli raccolte lungo i test di captazione epatica di BR (fegati, $n = 27$ ATP e $n = 32$ LDH).

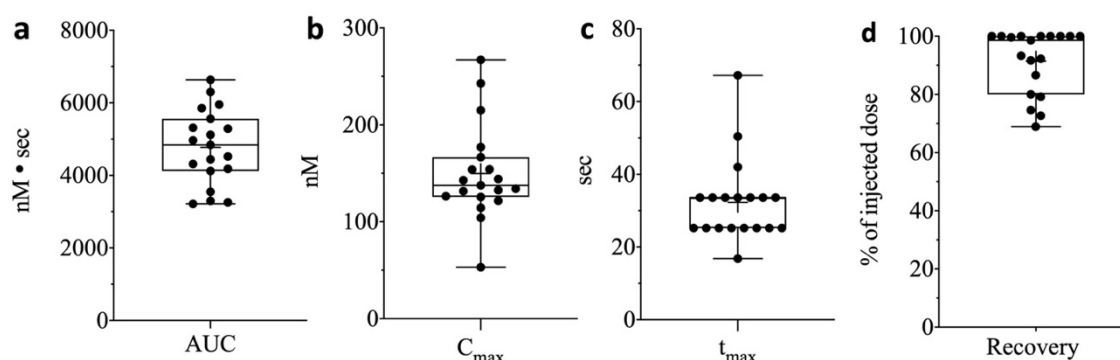


Figura 31B. Picchi di albumina sierica nell'effluente venoso epatico di fegati di ratto perfusi isolati. Box plot dei descrittori di picco BSA-FITC, risultanti dall'iniezione di un bolo di 0.2 mL di 5.15 mg/L di BSA contenente il 3% (p: p) di BSA-FITC. **a** dimensione del picco. **b** altezza del picco. **c** tempo per raggiungere il picco. **d** Recupero. I valori medi e le deviazioni standard sono: $AUC = 4777 \pm 1036$ nM·sec; $C_{max} = 149.8 \pm 49.17$ nM; $t_{max} = 32.27 \pm 11.29$ sec; Recupero = 91.46 ± 10.94 %; (fegati, $n = 19$).

Il dotto biliare non è stato incannulato per evitare sia alterazioni dei risultati sperimentali sia la colestasi (casuale) (Kato et al. 2016). Sono stati iniettati nella vena porta fino a 12 boli di BR durante un test di perfusione della durata di circa 25 minuti e l'effluente della perfusione è stato analizzato per valutare il deflusso di BR. Ben noti inibitori/substrati dei trasportatori sinusoidali epatici sono stati co-iniettati con BR, per osservare il loro effetto sull'assorbimento di BR. La loro scelta e le dosi sono state determinate secondo vari criteri, come riassunto nella tabella 1. L'obiettivo principale era quello di indentificare i trasportatori di membrana sinusoidale coinvolti nell'assorbimento epatico di BR, come Oatps e bilitranslocasi (Čvorović e Passamonti 2017).

4. Assorbimento epatico della bilirubina: l'effetto della cianidina 3-glucoside

In un primo set di tre esperimenti sono state testate concentrazioni differenti di C3G: esso è stato selezionato come potenziale inibitore del trasporto della bilirubina, perché si è dimostrato un inibitore competitivo dell'assorbimento elettrogenico della sulfobromoftaleina (BSP) nelle vescicole della membrana plasmatica del fegato di ratto ($K_i = 5.8 \mu\text{M}$) (Passamonti et al., 2002). Questo saggio è correlato all'attività di trasporto della bilitranslocasi, un trasportatore di BSP legante la bilirubina (Lucia Battiston et al. 1998; Choudhury, Sikorska, van den Boom, Bayer, Popenda, Szutkowski, Jurga, Bonomi, Sali, Zhukov, et al. 2015), inibito in modo competitivo dalla bilirubina (Sabina Passamonti, Cocolo, et al. 2005).

C3G, come è stato già descritto, è un pigmento antocianico alimentare presente nelle bacche rosse e nel vino. È un composto polifenolico con tautomeria fenolico-chinolica dipendente dal pH (Rusishvili et al. 2019). Pertanto, è simile al noto colorante sintetico sulfobromoftaleina (BSP), precedentemente utilizzato negli studi sull'uptake epatico della bilirubina (Scharschmidt, Waggoner, e Berk 1975). A differenza di BSP, che viene trasportato da più membri delle superfamiglie trasportatrici SLCO e SLC22, il C3G sembrerebbe inibire solo la bilitranslocasi, ma nessun membro delle superfamiglie trasportatrici SLCO e SLC22 (Stieger, Mahdi, e Jäger 2017; X. Chan 2014; X. Wang, Wolkoff, e Morris 2005).

Più test di assorbimento della bilirubina e della sua inibizione farmacologica sono stati eseguiti in sequenza nella stessa preparazione, al fine di osservare la ripetibilità dei fenomeni sia in condizioni di controllo che di test.

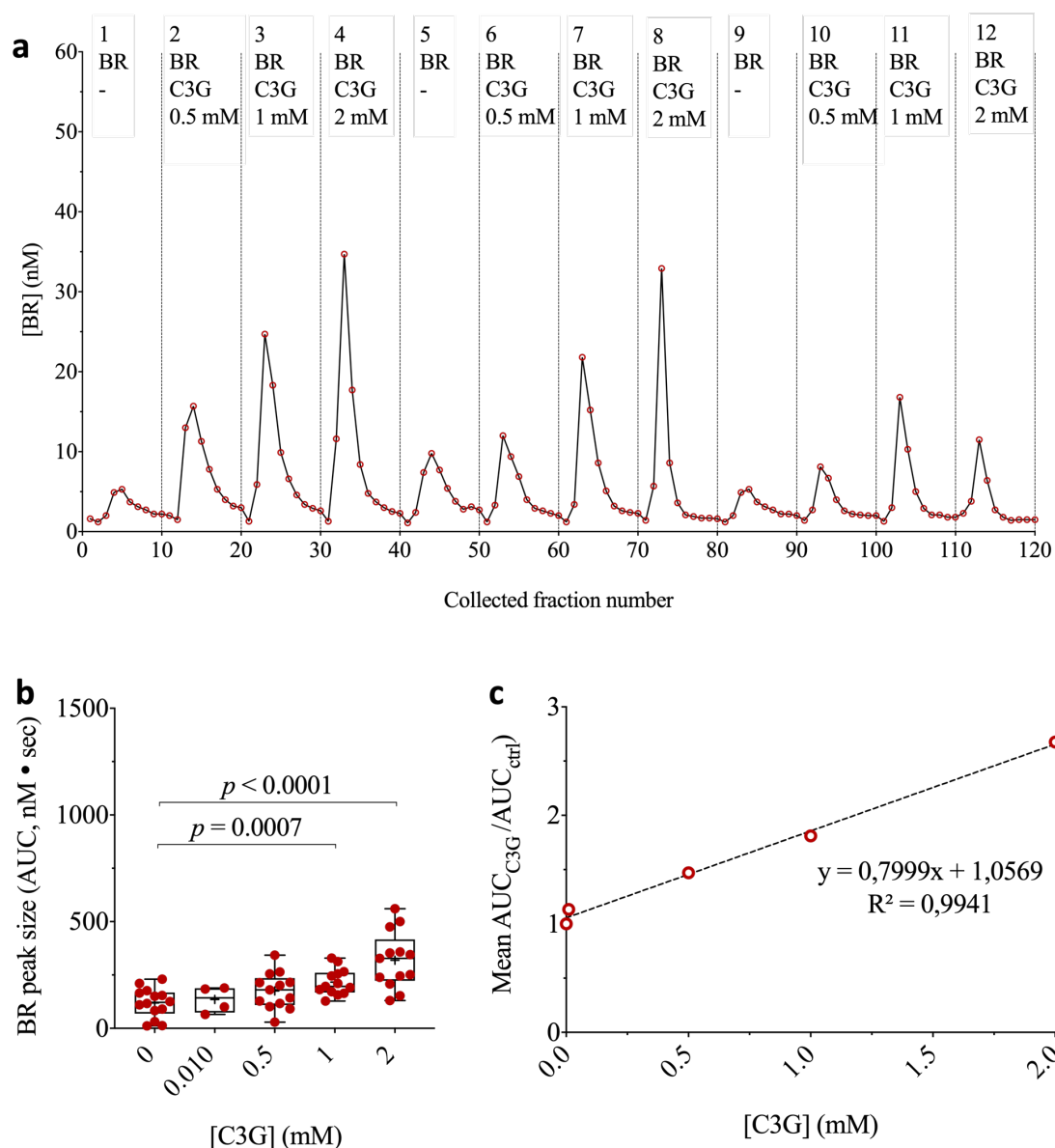


Figura 32. L'effetto dose-dipendente di C3G sulla captazione epatica di BR. **a**

Concentrazione di BR nell'effluente venoso di un fegato di ratto isolato e perfuso rappresentativo, a seguito di inoculazione di boli sequenziali di 0.05 mM BR senza o con concentrazioni crescenti di C3G. **b** Box plot delle aree dei picchi di BR risultanti dalla co-iniezione di BR con diverse concentrazioni di C3G (fegati, $n = 7$; aree dei picchi: 0 mM, $n = 14$; 0.010 mM, $n = 4$; 0.5 mM, $n = 13$; 1 mM, $n = 13$; 2 mM, $n = 13$). **c** La relazione tra la concentrazione di C3G e la dimensione del picco BR.

La figura 32 mostra le variazioni della concentrazione di bilirubina nell'effluente della perfusione epatica dalla vena cava inferiore, quando boli di bilirubina da soli o con quantità crescenti di C3G venivano iniettati in sequenza nella vena porta. Quando la bilirubina è stata

iniettata da sola, è stato osservato un minimo aumento del livello basale nell'effluente. Tuttavia, la co-iniezione di bilirubina e C3G ha prodotto un picco di bilirubina nell'effluente, la cui area era in qualche modo dipendente dalla concentrazione di C3G (figura 32b e 32c). Questi dati suggeriscono una captazione epatica essenzialmente completa della bilirubina. L'effetto di C3G mostra che il trasporto della bilirubina dal fluido sinusoidale al fegato era mediato da un trasportatore specifico degli antociani, sebbene altri meccanismi, come la diffusione passiva (Zucker, Goessling, e Hoppin 1999) o facilitata dal trasportatore (Wolkoff 2014; Čvorović e Passamonti 2017), possono coesistere.

Inoltre, in un singolo esperimento, è stato studiato l'effetto opposto, infatti, sono state co-iniettate concentrazioni crescenti di BR con la stessa dose di C3G (figura 33), ottenendo picchi di BR, la cui AUC diminuisce in funzione non lineare alla concentrazione di BR.

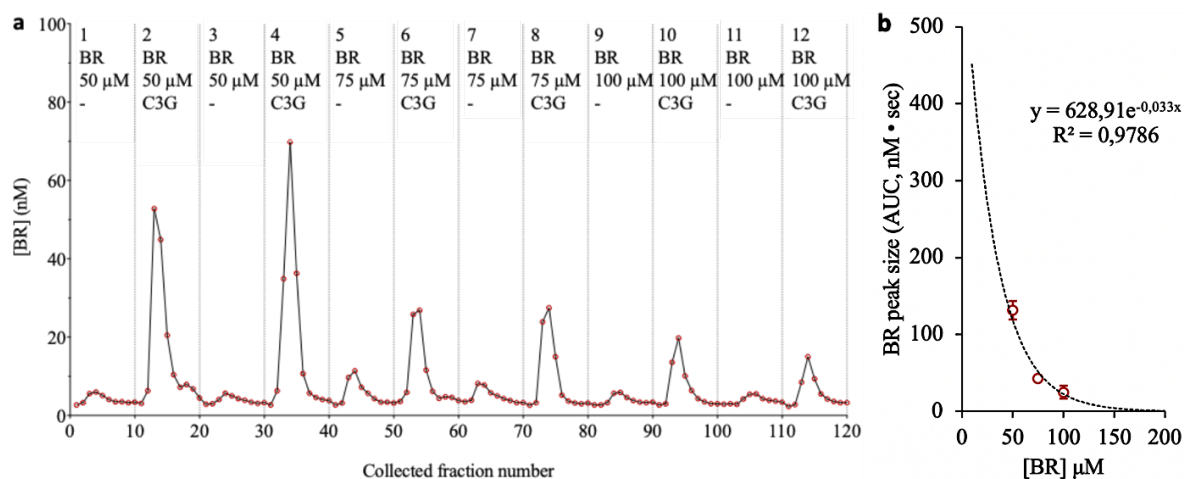


Figura 33. L'effetto della cianidina 3-glucoside sulla captazione epatica di diverse dosi di bilirubina. **a** Concentrazioni di bilirubina (BR) nell'effluente venoso di un fegato di ratto perfuso isolato rappresentativo, a seguito di bolo intra-portale sequenziale (0.2 mL) di 0.05, 0.75, 0.1 mM BR, senza e con 2 mM di cianidina 3-glucoside (C3G). **b** Dipendenza della dimensione del picco BR risultante da boli di BR con C3G, dalla dose BR iniettata.

La curva mostra che piccoli cambiamenti nelle concentrazioni di BR intorno a 50 μM determinano grandi cambiamenti nelle aree dei picchi di BR, il che può spiegare la dimensione variabile dell'effetto di C3G mostrata in figura 34c. Pertanto, sono stati eseguiti altri test di inibizione della captazione della bilirubina.

4.1. Assorbimento epatico della bilirubina: il confronto tra cianidina 3-glucoside e pravastatina

Successivamente si è voluto valutare l'effetto di C3G e di pravastatina: C3G, come è già stato descritto precedentemente, inibisce l'attività di trasporto della bilitranslocasi ($K_i = 5,8 \mu\text{M}$) (Sabina Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002a), ma non ha nessuna attività nei confronti delle superfamiglie dei trasportatori SLCO e SLC22 (Stieger, Mahdi, e Jäger 2017; X. Chan 2014; X. Wang, Wolkoff, e Morris 2005; Riha et al. 2015).

La pravastatina, invece, è un substrato del trasportatore Oatp2 (Slc1a4) nel fegato di ratto (Tokui et al. 1999) e un inibitore della rOat (Slc22a7) (Khamdang et al. 2004), ma non della bilitranslocasi (Župerl et al. 2011).

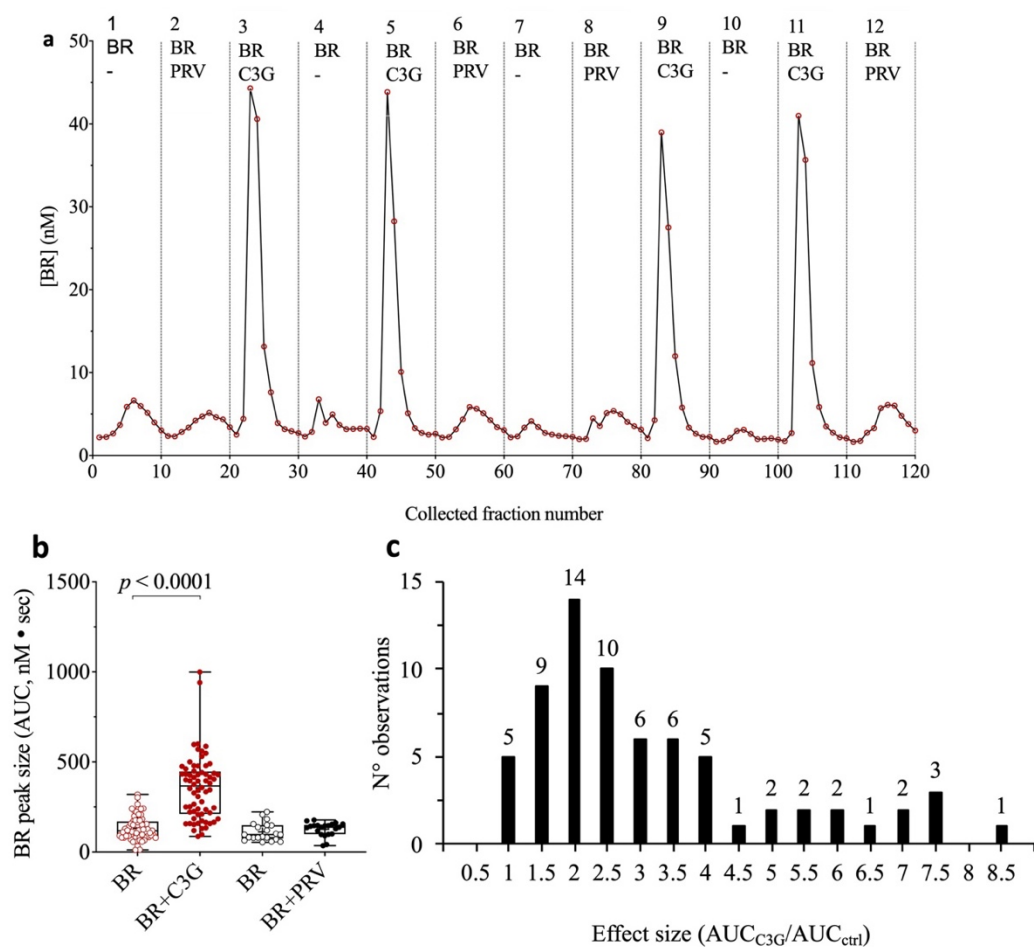


Figura 34. Gli effetti di C3G e PRV sulla captazione epatica di BR. **a** Concentrazioni di BR nell'effluente venoso di un fegato di ratto perfuso isolato rappresentativo, a seguito di bolo intraportale sequenziale (0.2 mL) di 0.05 mM BR senza e con 2 mM C3G o 6 mM PRV. **b** Box plot delle aree dei picchi BR, risultanti dalla co-iniezione di 0.05 mM BR senza (simboli aperti) o con 2 mM C3G (cerchi rossi pieni) (fegati, $n = 21$; aree dei picchi, $n = 68$) o 6 mM PRV (cerchi neri pieni) (fegati, $n = 6$; aree dei picchi, $n = 21$). **c** Analisi della frequenza dell'entità dell'effetto dell'inibizione di C3G dell'assorbimento di BR epatico. La dimensione dell'effetto è calcolata come rapporto di ciascuna area di picco risultante dalla co-iniezione di BR con C3G (AUC_{C3G}) rispetto a ciascuna rispettiva area di picco di BR di controllo (AUC_{BR}) (fegati, $n = 21$; coppie di picchi, $n = 68$).

La figura 34a mostra le concentrazioni di BR nell'effluente della perfusione epatica dalla vena cava inferiore, a seguito di boli successivi iniettati in vena porta di sola bilirubina o con pravastatina o C3G. Quando la bilirubina è stata iniettata da sola o con pravastatina è stata

recuperata nell'effluente una piccola concentrazione di BR, mentre la co-iniezione di bilirubina e C3G ha prodotto un picco di BR acuto e alto.

In questo studio, in tutti gli esperimenti è stato introdotto almeno una volta il test di inibizione C3G nell'assorbimento di BR, come controllo funzionale delle preparazioni epatiche.

Abbiamo analizzato 68 test di assorbimento di BR senza o con 2 mM C3G eseguiti in 21 fegati e 21 test di assorbimento di BR senza o con 6 mM PRV eseguiti in 6 fegati. La figura 34b mostra l'analisi del picco di BR da sola o in presenza degli specifici inibitori. A differenza della pravastatina che era inattiva, la C3G ha provocato un aumento di 3 volte in tutti i parametri principali dell'AUC (cioè mediana, media, massimo). Più pronunciato è stato l'effetto di C3G sulla C_{max} , con un aumento di 6 volte sia dei valori medi che mediani (figura 34c). Non sono state notate differenze tra i picchi di BR causati da C3G, sia nell'ordine delle somministrazioni sia nella ripetizione delle somministrazioni (figura 34b), questo ha permesso l'analisi di tutti i picchi indotti da C3G rispetto a tutti i controlli.

Un'analisi più dettagliata nella figura 34c mostra la frequenza della dimensione (AUC) dell'effetto di C3G caso per caso. I dati mostrano che l'osservazione più frequente (21%) è stata un aumento di 2 volte dell'AUC, ma per il 61% delle osservazioni si ha un aumento maggiore a 2 ed in particolare per il 16% dei casi si assiste ad un aumento maggiore di 5 volte. Gli effetti negativi (rapporto AUC = 1) erano la minoranza (7.5%), che si verificava in modo casuale (e mai in serie) in alcune preparazioni.

4.2. Uptake epatico della cianidina 3-glucoside: effetto della bilirubina

Dato che C3G inibisce un trasportatore per BR nel fegato, si può presumere che C3G sia un substrato dello stesso trasportatore per BR e quindi BR dovrebbe inibire l'assorbimento epatico di C3G. Pertanto, abbiamo esplorato l'assorbimento di C3G nel fegato di ratto perfuso isolato, mediante ripetuti boli portalici di C3G a concentrazioni crescenti, da solo o con 0.05 mM di BR (figura 35). L'analisi C3G nelle frazioni effluenti ha mostrato picchi ampi, con C_{max} nell'intervallo del μ M. I valori di AUC dei picchi di C3G non indicavano un assorbimento epatico netto di C3G. Tuttavia, P3G è apparso nell'effluente con una tendenza all'aumento approssimativamente lineare che non è stata influenzata dall'aggiunta di boli. Il recupero di P3G nelle 200 frazioni analizzate (10 boli) è stato di 31.12 nmol, cioè circa 9 % del totale C3G

iniettato (344 nmol). Se circa l'1% di ogni bolo C3G viene trattenuto durante il suo passaggio nelle sinusoidi, questa piccola frazione non può essere stimata mediante il calcolo dell'AUC. Coerentemente, qualsiasi inibizione della captazione non sarebbe rilevabile, poiché una frazione schiacciante di C3G (circa 99 %) transita attraverso la sinusoide. Questi dati sono coerenti con il riscontro della distribuzione epatica di una i.v. bolo di C3G nel ratto, dove solo lo 0,64% della dose iniettata è stato recuperato nel fegato come C3G più i suoi metaboliti 15 secondi dopo l'iniezione e questa frazione è diminuita a causa sia dell'efflusso sinusoidale che della secrezione biliare (Fornasaro et al. 2016; Vanzo et al. 2011).

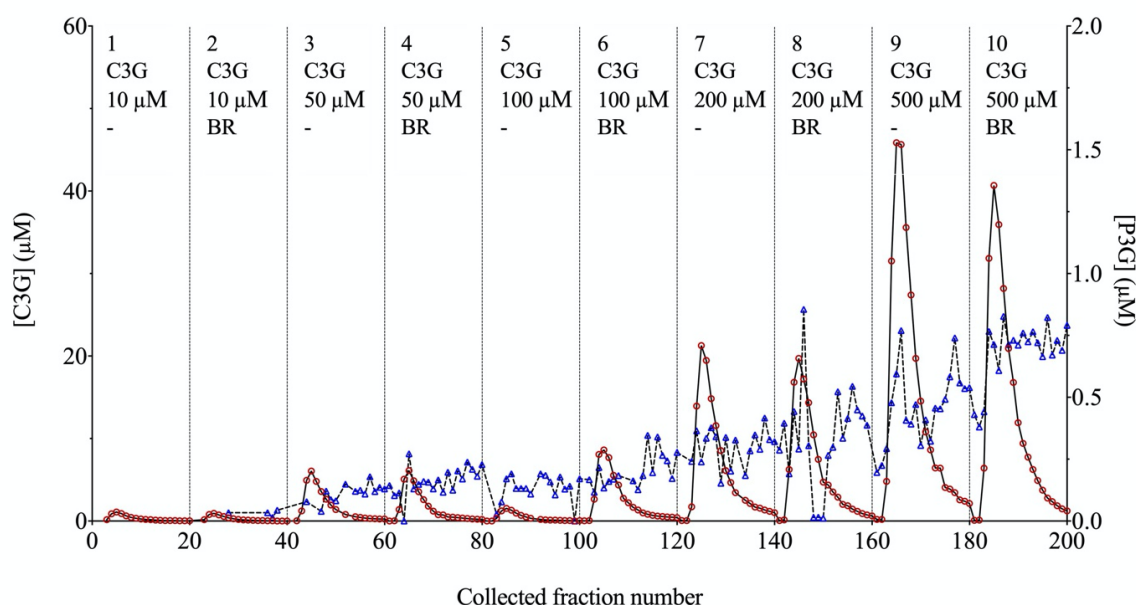


Figura 35. L'effetto della bilirubina sull'assorbimento epatico della cianidina 3-glucoside e sull'efflusso della peonidina 3-glucoside. Concentrazione di C3G (in rosso) e P3G (in blu) nell'effluente venoso di un fegato di ratto perfuso isolato, a seguito di bolo sequenziale (0,2 mL) con concentrazioni crescenti di C3G (0.01, 0.05, 0.1, 0.2 e 0.5 mM) senza o con 0,05 mM BR.

4.3. Assorbimento epatico della bilirubina: l'effetto della peonidina 3-glucoside e della malividina 3-glucoside

In un esperimento su una singola preparazione, abbiamo testato l'effetto di C3G, peonidina 3-glucoside (P3G) e malividina 3-glucoside (M3G) sull'assorbimento di BR. P3G e M3G sono i più potenti inibitori delle antocianine dell'attività di trasporto della bilitranslocasi nelle vescicole della membrana plasmatica del fegato di ratto ($K_i = 1.8$ e $1.4 \mu\text{M}$, rispettivamente)

(Sabina Passamonti, Vrhovsek, e Mattivi 2002). Pertanto, ci si aspettava che si comportassero come C3G. In effetti, M3G ha mostrato lo stesso effetto sull'assorbimento di BR di C3G (figura 36), sebbene con minore efficacia ($AUC_{C3G}/AUC_{M3G} = 1.70$). Al contrario, P3G era essenzialmente inattivo sull'assorbimento di BR. Supponendo che il trasportatore mirato dagli antociani nel fegato intatto e nelle vescicole di membrana plasmatica sia lo stesso, l'effetto discrepante di P3G nei due preparati potrebbe essere dovuto alla proprietà del P3G di legare il trasportatore solo al vestibolo intracellulare del sito di trasporto, ovviamente inaccessibili nell'organo intatto ma accessibili nelle vescicole, che sono orientate casualmente verso il mezzo (destro e rovescio). Se così fosse, si dovrebbe dedurre che il trasportatore BR è bidirezionale, almeno con il substrato BSP. Con l'ultimo bolo abbiamo co-iniettato BR con *trans*-resveratrolo, una molecola inattiva nel saggio di trasporto elettrogenico della BSP dell'attività della bilitranslocasi nelle vescicole (Terdoslavich et al. 2013) e in questa preparazione.

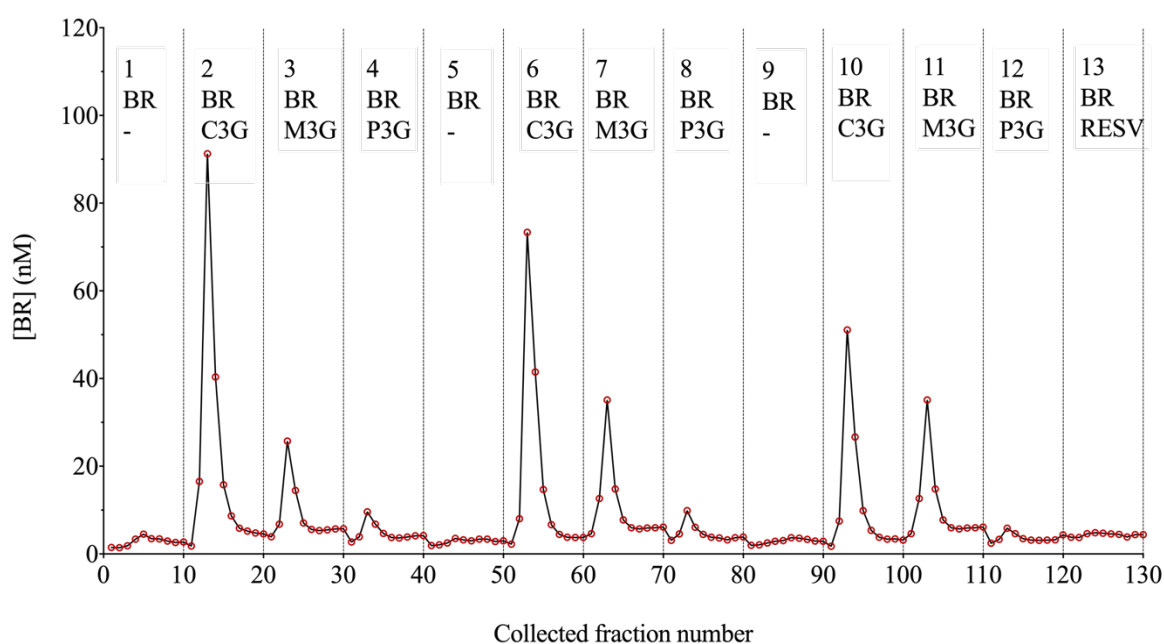


Figura 36. L'effetto della cianidina 3-glucoside, della malvidina 3-glucoside e della peonidina 3-glucoside sull'assorbimento epatico della bilirubina. Concentrazione di bilirubina nell'effluente venoso di un fegato di ratto perfuso isolato, dopo bolo sequenziale (0,2 mL) di 0.05 mM BR senza o con 2 mM cianidina 3-glucoside (C3G), malvidina 3-glucoside (M3G), peonidina 3-glucoside (P3G), o *trans*-resveratrolo (RESV).

5. Assorbimento epatico della bilirubina e della bilirubina glucuronide: l'effetto di cianidina 3-glucoside, pravastatina e β -estradiolo 17-(β -D-glucuronide)

Dopo questi studi preliminari, che però hanno reso impossibile confermare o meno se i trasportatori SLCO abbiano un ruolo nel trasporto della bilirubina negli studi sui topi (Terdoslavich et al. 2013) e sull'uomo (Kotsampasakou, Escher, e Ecker 2017), si è deciso di studiare gli OATP, che influenzano l'assorbimento epatico della bilirubina glucuronide (BRG) (van de Steeg et al. 2012). Il fegato perfuso è in grado di rilasciare BRG (Barnhart e Clarenburg, 1973), questo ci ha incuriosito e per questo abbiamo deciso di analizzare sia la bilirubina che la BRG nell'effluente dal fegato, dopo aver iniettato nella vena porta o bilirubina da sola o in presenza di inibitori dei trasportatori sinusoidali. Oltre alla pravastatina, abbiamo testato il β -estradiolo 17-(β -D-glucuronide) (E17G), che è un substrato ad alta affinità dei trasportatori SLCO (Hagenbuch e Stieger 2013), ma non della bilitranslocasi (Župerl et al. 2011).

Nella figura 37a si osserva che il C3G ha determinato due picchi simultanei di BR (pallini in rosso) e BRG (triangoli in blu). Il E17G, invece, non ha avuto alcun effetto sull'assorbimento di BR, mentre causa una sostanziale inibizione dell'assorbimento di BRG, anche quando viene iniettato da solo come si osserva alla fine della prova di perfusione (frazioni 100-120). Questo effetto è stato osservato più volte: co-iniettando BR + C3G, rispetto al controllo (figura 37b), o co-iniettando BR + E17G, sempre rispetto al controllo (figura 37c) o iniettando solo E17G (figura 37d).

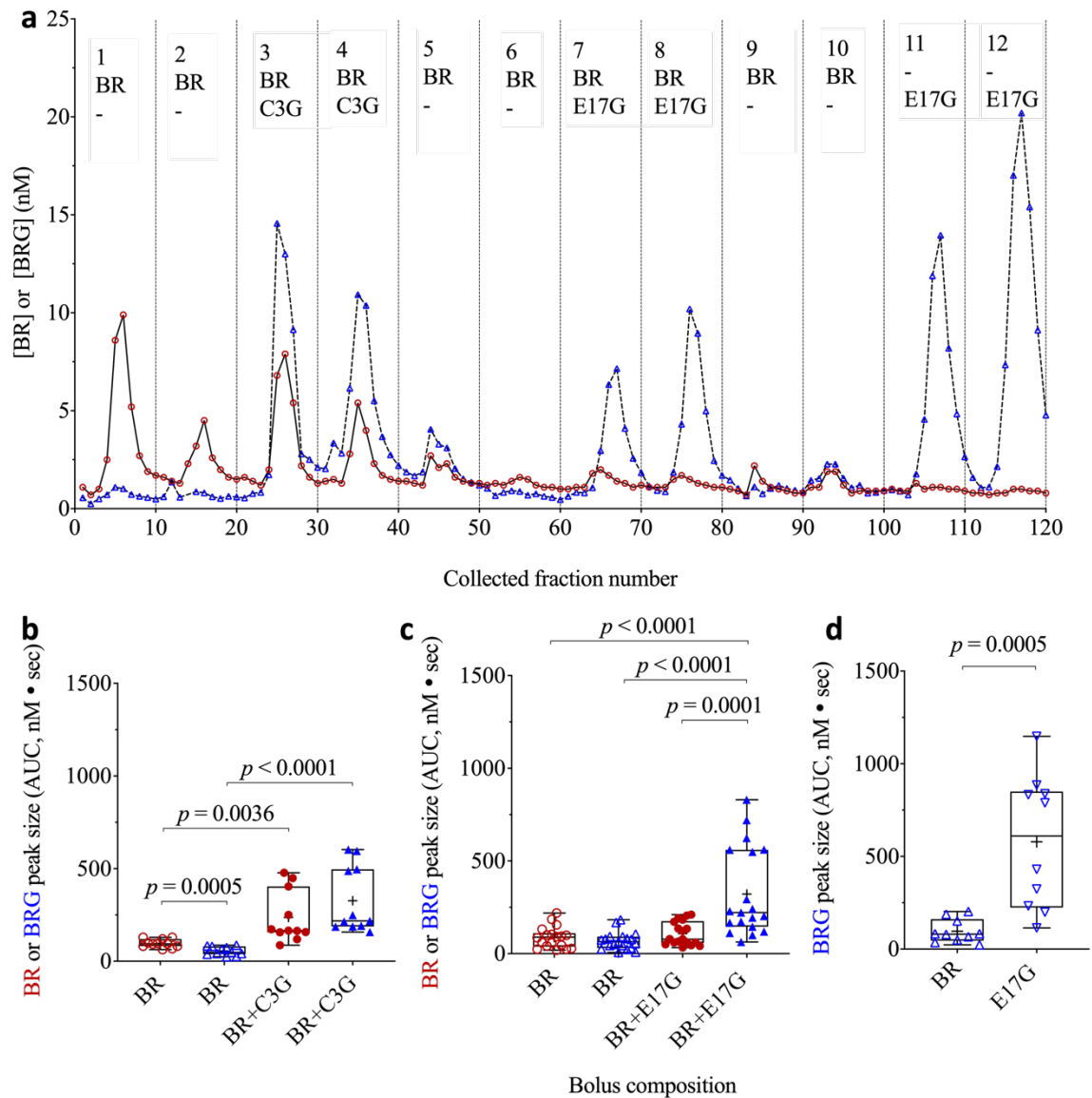


Figura 37. Gli effetti di C3G e E17G sulla captazione epatica sia di BR che di BRG. **a** Concentrazioni di BR (in rosso) e BRG (in blu) nell'effluente venoso di un fegato perfuso isolato rappresentativo, a seguito di bolo intraportale sequenziale (0,2 mL) di 0,05 mM BR senza o con 2 mM C3G o 1 mM E17G. **b** Box plot delle aree dei picchi di BR (in rosso) o BRG (in blu), risultanti da boli di 0.05 mM BR senza (simboli vuoti) o con 2 mM C3G (simboli chiusi) (fegati, $n = 7$; aree di picco, $n = 11$). **c** Box plot delle aree dei picchi di BR (in rosso) o BRG (in blu), risultanti da boli di 0.05 mM BR senza (simboli vuoti) o con 1 mM E17G (simboli chiusi) (fegati, $n = 14$; aree dei picchi, $n = 19$). **d** Box plot delle aree dei picchi BRG, risultanti da boli di 0.05 mM BR o 1 mM E17G (fegati, $n = 7$; aree dei picchi, $n = 10$).

La pravastatina ha agito come E17G, inibendo solo l'assorbimento di BRG; infatti, né l'AUC né la C_{max} risultano significativi a differenza dell'effetto del C3G (figura 38).

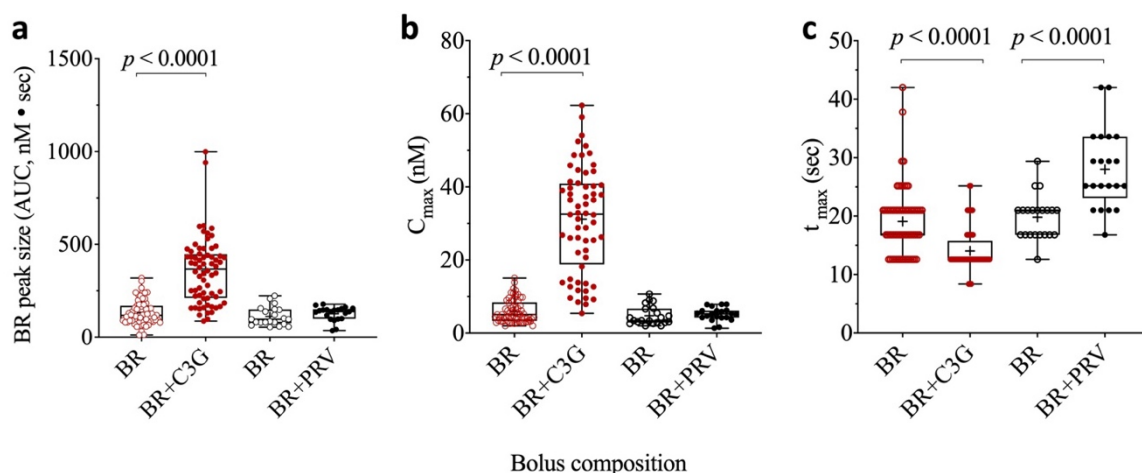


Figura 38. L'effetto di C3G e PRV sui picchi di BR nell'effluente venoso epatico. Box plot dei descrittori di picco BR, ovvero aree (AUC) (a), altezze (C_{max}) (b) e tempo per raggiungere C_{max} (T_{max}) (c). I picchi BR sono risultati da boli di 0.05 mM BR senza (simboli vuoti) o con 2 mM C3G (fegati, $n = 21$; aree di picco, $n = 68$) o 6 mM PRV (simboli chiusi) (fegati, $n = 6$; picco aree, $n = 21$).

L'insieme di questi risultati mostrano che esiste un trasportatore di membrana sinusoidale, inibito da C3G, che determina l'assorbimento di BR dal fegato (99.9 % della dose cumulativa calcolata in questo esperimento), la coniugazione da parte dell'UDP glucuronosiltransferasi (UGT1A1) (in misura indeterminata) ed il trasporto di nuovo nel sinusoidale di una piccola quantità di BRG (0.13% della frazione assorbita calcolata in questo esperimento). Si è verificato prima un efflusso di BRG nel sinusoidale e poi il suo completo riassorbimento, determinando così dei livelli di BRG nell'effluente inferiori a quelli di BR. L'esistenza di questo ciclo di ricaptazione di BRG è diventata evidente solo nel momento in cui è stata inibita sia da inibitori specifici di C3G che di Oatp. I nostri dati confermano il ruolo prominente di Oatps nella ricaptazione epatica di BRG (van de Steeg et al. 2012), aggiungendo nuove prove contro l'idea che Oatp media il trasporto di BR nel fegato.

I dati mostrano altre due interessanti caratteristiche del trasporto BRG sinusoidale: la prima è l'apparente esistenza di meccanismi distinti del suo assorbimento. Infatti, C3G ha inibito l'assorbimento sia di BR che di BRG, mentre E17G e pravastatina hanno inibito specificamente solo il trasporto di BRG. La seconda caratteristica riguarda l'efflusso di BRG, che non è stato

influenzato dall'E17G, nonostante l'efflusso di BRG sia catalizzato da Mrp3 (Zelcer et al. 2006), un trasportatore attivo primario di E17G (Akita et al. 2002). Entrambe le caratteristiche sono state ulteriormente verificate mediante altri esperimenti.

5.1. Comprensione dell'inibizione della cianidina 3-glucoside sull'assorbimento sinusoidale della bilirubina glucuronide

Nei successivi esperimenti, abbiamo caratterizzato in modo più preciso sui diversi effetti di C3G ed E17G sull'assorbimento di BR e/o BRG. L'ipotesi era che C3G dovrebbe inibire la ricaptazione di BRG anche se iniettato da solo, in modo simile a E17G e pravastatina.

Nell'esperimento mostrato in figura 39a, si osserva che se il C3G viene co-iniettato con la BR determina la comparsa di due picchi sovrapposti di BR e BRG, ma se viene somministrato da solo, risulta inefficace. Al contrario, l'E17G ha prodotto la formazione di picchi sulla BRG, ma non ha avuto alcun effetto sull'assorbimento di BR, inoltre risultava attivo anche se iniettato da solo figura 39a e b.

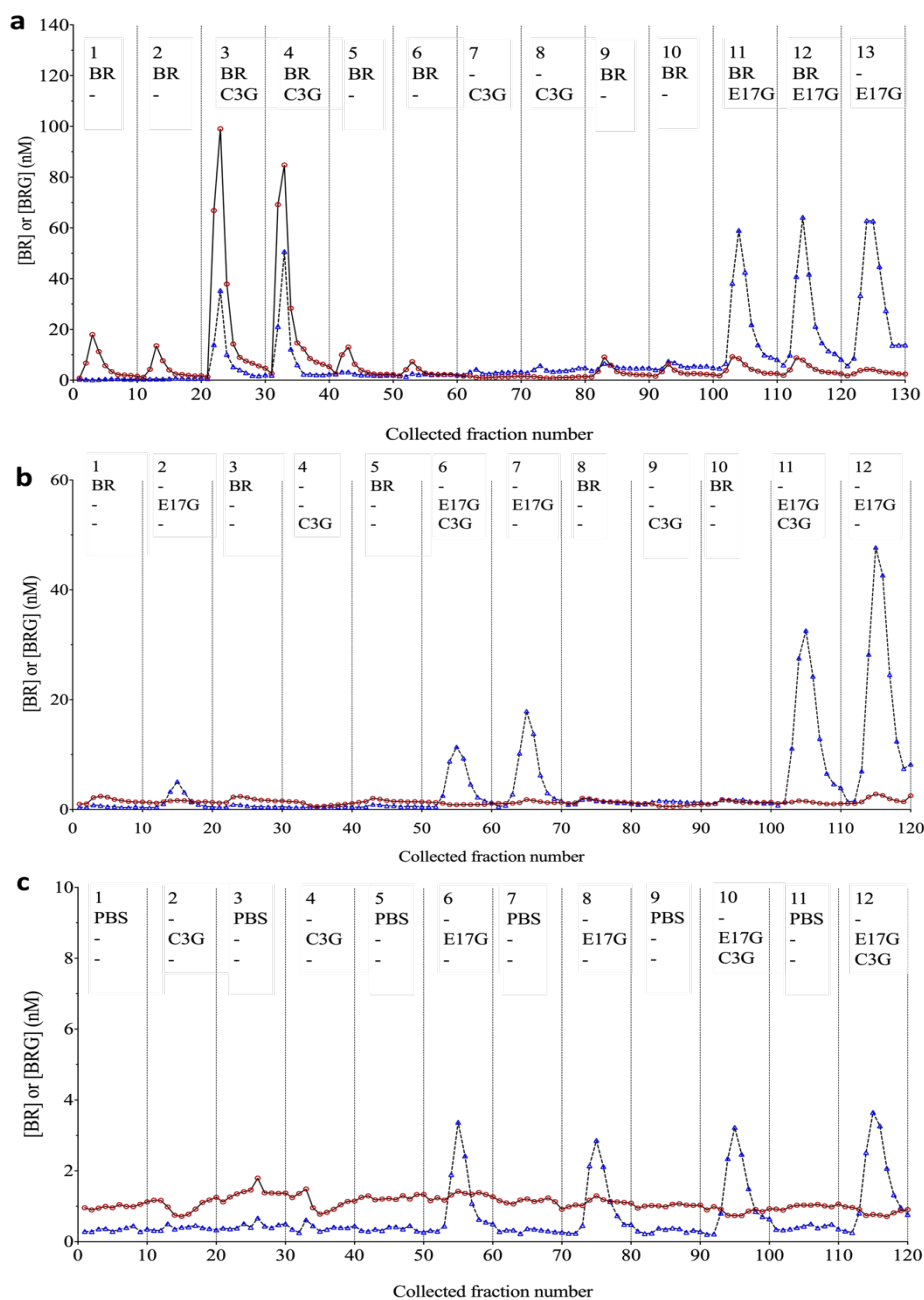


Figura 39. L'azione di C3G sulla captazione epatica di BRG, quando iniettato senza BR. Concentrazioni di BR (in rosso) e BRG (in blu) nell'effluente venoso di fegati di ratto perfusi isolati rappresentativi. **a** Fegato pre-esposto a BR. Una serie di 6 boli intra-portali (0,2 ml ciascuno), contenenti 0.05 mM BR senza o con 2 mM C3G, è stata seguita da 2 boli intra-portali di 2 mM C3G solo; quindi, una serie di 4 boli intra-portali, contenenti 0.05 mM BR senza o con 1 mM E17G, è stata seguita da un bolo di 1 mM E17G solo. **b** Fegato esposto a BR. Boli intra-portali sequenziali di 2 mM C3G o 1 mM E17G o entrambi, senza pre o co-iniezione di BR. **c** Fegato non esposto a BR. Boli intra-portali sequenziali di 2 mM C3G o 1 mM E17G o entrambi, senza pre o co-iniezione di BR.

Per migliorare la caratterizzazione dei distinti effetti di C3G ed E17G, abbiamo testato i loro effetti sui livelli basali di BR e BRG, cioè su fegati che non sono mai stati esposti a carichi di BR. Come mostrato in figura 40a, la concentrazione di BR nell'effluente era abbastanza costante, tranne quando sono stati iniettati boli di C3G, che determinavano una diminuzione transitoria dell'uscita di BR, come se C3G avesse inibito un trasportatore di efflusso di BR. I livelli basali di BRG non sono stati influenzati da C3G, ma quando è stato iniettato E17G si sono formati dei picchi acuti (figura 40b). La co-somministrazione di C3G ed E17G ha prodotto picchi non diversi dal solo E17G (figura 39b boli 10 e 12, frazioni 90-100 e 110-120). Questi dati implicano che c'era disponibilità intracellulare sia di BR che di BRG, che erano stati rilasciati costitutivamente nel sinusoidale. L'uscita BRG è stata mantenuta costante dal riassorbimento sinusoidale.

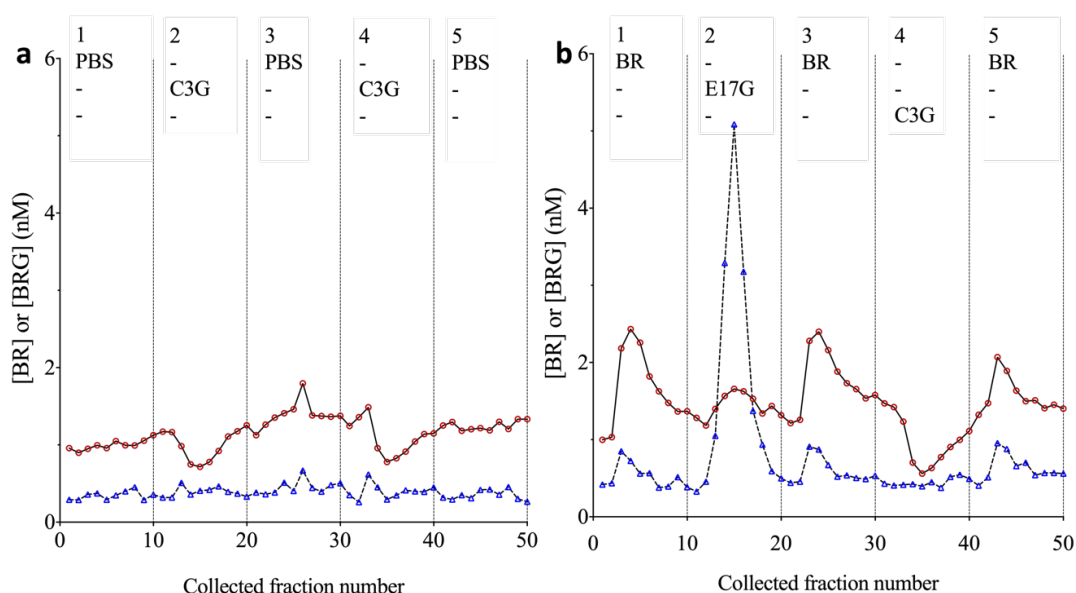


Figura 40. L'effetto della cianidina 3-glucoside sull'efflusso della bilirubina dal fegato. **a** Fegato non esposto a BR. Boli intra-portali sequenziali di soluzione PBS senza (PBS) o con cianidina 3-glucoside 2 mM (C3G). **b** Fegato esposto a BR. Boli intra-portali alternati di 0.05 mM BR o 1 mM E17G o 2 mM C3G.

Questi dati indicano che C3G provoca un improvviso aumento della concentrazione di BR lungo l'intero sinusoidale ed a sua volta inibisce un trasportatore sconosciuto per BRG, ma che non è direttamente preso di mira da C3G o E17G.

6. Assorbimento epatico della bilirubina e della bilirubina glucuronide: l'effetto dei farmaci antinfiammatori non steroidei

Attraverso i primi studi funzionali è stato possibile dimostrare l'esistenza di un trasportatore sinusoidale di membrana per BRG, che era inibito in modo competitivo dal BR e dal verde indocianina (ICG), ma no dal glicocolato (Shupeck et al. 1978; Adachi et al. 1990). Abbiamo ipotizzato che un possibile candidato per questa funzione possa essere rOat2 (Slc22a7), poiché l'ICG è un buon inibitore della sua attività di trasporto, a differenza del taurocolato e della pravastatina (Naomi Morita et al. 2005). Pertanto, abbiamo testato gli effetti dei substrati ketoprofene o indometacina per Oat2 (N. Morita et al. 2001) sull'efflusso e sull'uptake di BR e BRG, sia da soli che quando co-iniettati con bilirubina. I dati di questo modello sperimentale hanno mostrato che i due substrati erano sempre inattivi (figura 41), escludendo, quindi, che Oat2 fosse coinvolto nel trasporto di BR e BRG.

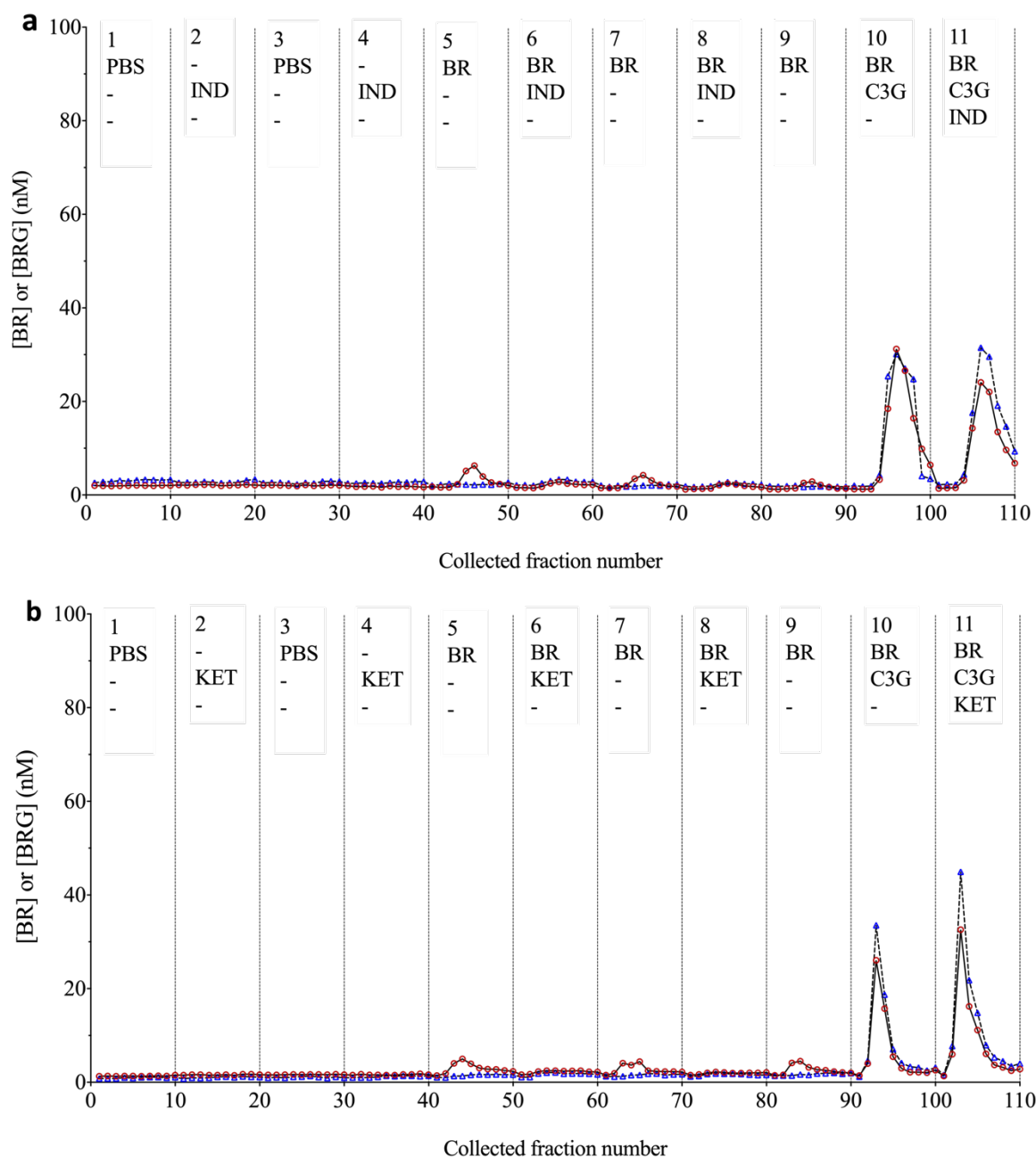


Figura 41. Gli effetti di indometacina e ketoprofene sulla captazione epatica di BR e BRG. Concentrazioni di BR (cerchi rossi) e BRG (triangoli blu) nell'effluente venoso di fegati di ratto perfusi isolati rappresentativi. Boli di indometacina 1 mM (**a**) o ketoprofene 1 mM (**b**) sono stati iniettati da soli (boli 2, 4), con 0.05 mM BR (boli 6, 8), o con entrambi 0.05 mM BR e 2 mM C3G (bolo 11); il bolo 10 è 0.05 mM BR con 2 mM C3G, come controllo dell'assorbimento di BR.

7. Analisi della bilirubina nel sangue, plasma e siero di ratto

È stata eseguita anche la quantificazione della bilirubina nel sangue di ratto e nelle sue frazioni (siero e plasma). Per l'analisi della fluorescenza dei tre diversi campioni sono stati prelevati 10 µL ed aggiunti a 1 mL di HUG. Dopo questa fase, solo i campioni di sangue sono stati centrifugati brevemente per far depositare i globuli rossi sul fondo delle Eppendorf. Successivamente, sono stati prelevati 0.2 mL della miscela HUG - campione biologico e sono stati posizionati in piastra in quadruplicato. La fluorescenza è stata registrata dopo 4 ore e i valori sono stati convertiti in concentrazioni di bilirubina mediante la retta standard, come descritto precedentemente.

Per confrontare i risultati ottenuti dal sangue di ratto con la concentrazione di bilirubina ottenuta nelle altre due frazioni è stata utilizzata la correzione per il valore di ematocrito.

L'ematocrito è la percentuale di volume occupata dai globuli rossi nel sangue. Nei ratti la percentuale di ematocrito varia tra il 37% e il 49% (Filho et al. 2017), con un valore medio del 43%.

Il valore medio dell'ematocrito è stato stimato tramite il conteggio dell'ematocrito di 5 ratti diversi. Dopo aver diluito il sangue 1 a 200 in PBS sono stati introdotti 10 µL camera di Thoma, sono stati contati 16 quadratini, aventi l'area di 0.0025 mm² e mediati. Il volume corpuscolare medio, MCV, utilizzato per questo calcolo era di 63 fL. I valori ottenuti, espressi in percentuale, sono i seguenti: 44.4, 38.3, 49.9, 38.8, 46.0. Tutti questi valori sono compresi nell'intervallo 37 – 49 % riportato per i ratti Wistar. La media calcolata per questi valori è pari a 43.5%, che risulta essere una buona approssimazione del valore riportato in letteratura (Filho et al. 2017).

Sono stati campionati 12 animali e sono state analizzate le concentrazioni di bilirubina nel sangue intero, plasma e siero. In figura 42 è mostrata la correlazione tra la bilirubina ottenuta nel siero o plasma con le concentrazioni trovate nel sangue, corrette per l'ematocrito.

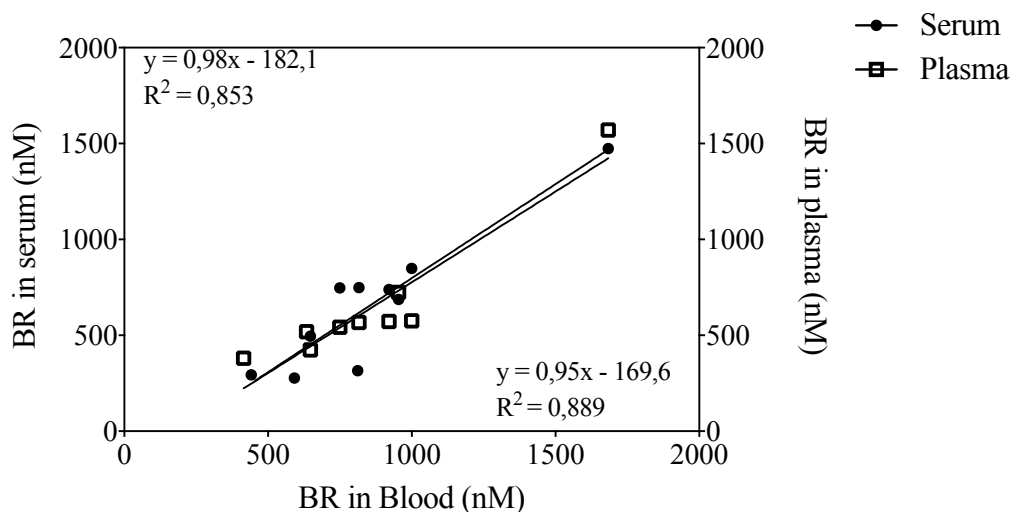


Figura 42. *Analisi della bilirubina nel sangue, plasma e siero. Le concentrazioni di bilirubina nel sangue intero sono state correlate a quelle ottenute nel siero e nel plasma. I dati sono stati analizzati mediante regressione lineare.*

L'analisi di regressione mostra che il coefficiente di correlazione è prossimo a 1, indicando che vi è una buona correlazione tra la misura effettuata nel siero o plasma con l'analisi effettuata nel sangue intero. Questo è un risultato molto utile, poiché l'analisi diretta della bilirubina nel sangue intero può essere vantaggiosa rispetto a quella in siero o plasma perché può essere analizzata immediatamente senza troppe manipolazioni, richiedendo anche un volume di campioni inferiore.

7.1. Analisi della bilirubina glucuronide nel siero e nel plasma di ratto

Dopo la prima lettura della fluorescenza utilizzata per la rilevazione della frazione di bilirubina non coniugata, è stata aggiunta nei pozzetti della micropiastra l'enzima β -glucuronidasi. La reazione viene lasciata incubare a 25°C per almeno 2 ore e la fluorescenza emessa dai campioni è stata nuovamente registrata. La tabella 7 mostra l'output strumentale della prima e della seconda registrazione di fluorescenza e le corrispondenti concentrazioni di bilirubina.

Ratto	F.I. (1)	Bilirubina (nM)	F.I. (2)	BR totale (nM)	C-BR (nM)	C-BR/Total BR (%)
1	5925	772	6141	801	29	3.6
2	4426	574	4690	609	35	5.7
3	5184	674	5565	725	50	7.0
4	13236	1741	14313	1883	142	7.6
5	5995	782	6395	835	53	6.3
6	3045	391	3371	435	43	9.9
7	6646	868	7238	946	78	8.2
8	1962	248	2174	276	28	10.1
9	3972	514	4351	564	50	8.9
10	11956	1571	12747	1676	105	6.2

Tabella 7. La tabella mostra la fluorescenza (F1) e la concentrazione calcolata di bilirubina nel plasma dei ratti. La fluorescenza (F2) e la concentrazione calcolata di bilirubina totale nel plasma dei ratti. La bilirubina coniugata (C-BR) come differenza calcolata tra la bilirubina totale e bilirubina (bilirubina non coniugata) ed il rapporto percentuale tra i livelli di bilirubina coniugata e la bilirubina totale.

La concentrazione di bilirubina glucuronide è stata calcolata come differenza tra le bilirubine ottenute con e senza la fase di reazione della β -glucuronidasi. Questa applicazione ottenuta utilizzando il saggio HUG risulta essere più facile e veloce rispetto il metodo diazo standard, applicato attualmente nella pratica clinica.

La tabella 7 mostra anche il rapporto percentuale tra i livelli di bilirubina coniugata e la bilirubina totale, che sono compresi nell'intervallo (6.2-12.2). Questi valori sono in linea con quelli descritti in letteratura nel plasma di ratto Wistar femmine (Muraca, Fevery, e Blanckaert 1987). Inoltre, non c'era alcuna differenza significativa tra le analisi eseguite nel siero o nel plasma, come mostrato in figura 43.

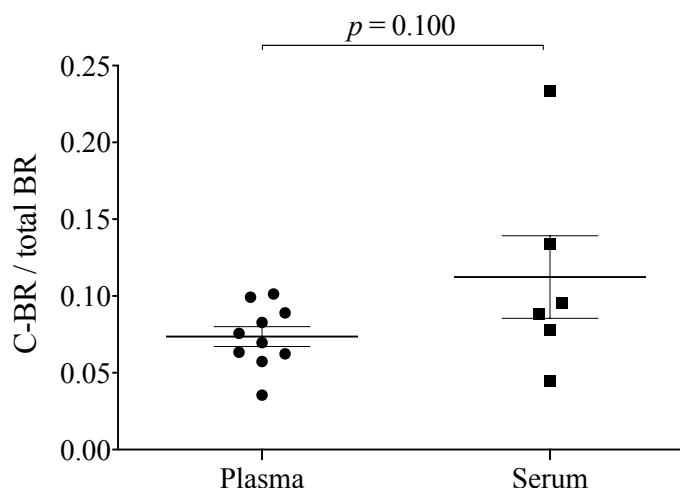


Figura 43. Rappresentazione grafica dei rapporti tra bilirubina coniugata (C-BR) e bilirubina totale (C-BR + BR) in 10 campioni di siero e 6 campioni di siero di ratti Wistar. Sono rappresentate le media con la rispettiva SEM (Standard Error of the Mean).

Queste analisi preliminari di correlazione tra plasma e siero con il sangue intero potranno permettere di svolgere studi futuri di farmacocinetica. I ratti riceveranno una dose intravenosa di antociani e verrà misurata la loro distribuzione nel sangue e negli organi (in particolare nel cervello), mediante l'utilizzo del saggio HUG, sarà possibile dosare le fluttuazioni di bilirubina libera e bilirubina glucuronata. Inoltre, potranno essere valutati i risultati ottenuti mediante HPLC-MS/MS, in collaborazione con partner esterni. Sarà possibile caratterizzare l'effetto degli antociani alimentari sulle funzioni cognitive in ratti con lesioni ippocampali. Questo esperimento sarà molto importante per mostrare una correlazione tra antociani, morfologia e comportamento.

7.2. Analisi della biliverdina nel siero di orata

Dopo l'analisi di bilirubina e bilirubina glucuronide, abbiamo iniziato ad analizzare anche la biliverdina, la messa a punto del metodo è stata fatta nel siero di 6 orate dato che le specie ittiche possiedono sia bilirubina che biliverdina nel sangue, a seconda dello stress ambientale (Hurk 2006) e nutrizionale (Fang e Bada 1990), mentre nei ratti la biliverdina è pressoché nulla, quindi difficile da stimare.

I campioni di siero sono stati divisi in due aliquote e analizzati per bilirubina e bilirubina glucuronide e per bilirubina e biliverdina, secondo il seguente schema:

1. Campione + HUG $\rightarrow$ BR-HUG (1) + Ea $\rightarrow$ BR-HUG (2)a

2. Campione + HUG $\rightarrow$ BR-HUG (1) + Eb $\rightarrow$ BR-HUG (2) b

dove:

- Ea ed Eb sono β -glucuronidasi e biliverdina reduttasi (e il suo co-substrato, NADPH + H⁺);
- BR-HUG (1) è il complesso HUG formato dalla bilirubina presente nel campione;
- BR-HUG (2) a e BR-HUG (2) b sono complessi HUG formati dalla bilirubina risultante dalla reazione catalizzata dagli enzimi aggiunti.

Pertanto, ciascuna aliquota ha prodotto un valore basale di bilirubina libera, che poi è aumentato in seguito alle due reazioni enzimatiche, ottenendo così la bilirubina glucuronide (aliquota 1) e la biliverdina (aliquota 2). I dati mostrati sono stati analizzati considerando la curva di calibrazione standard $y = 755,6x + 91,0$. La concentrazione dei pigmenti biliari sierici dei sei campioni di pesce è mostrata nella tabella 8.

Pesce	Bilirubina (nM)	Bilirubina coniugata (nM)	Biliverdina (nM)
1	5.58	0.81	34.96
2	23.51	2.88	83.27
3	6.63	0.70	74.20
4	5.00	0.85	37.24
5	6.36	1.61	66.52
6	7.08	1.39	101.80

***Tabella 8.** Concentrazione dei tre pigmenti analizzati in 6 campioni. Gli outlier sono evidenziati.*

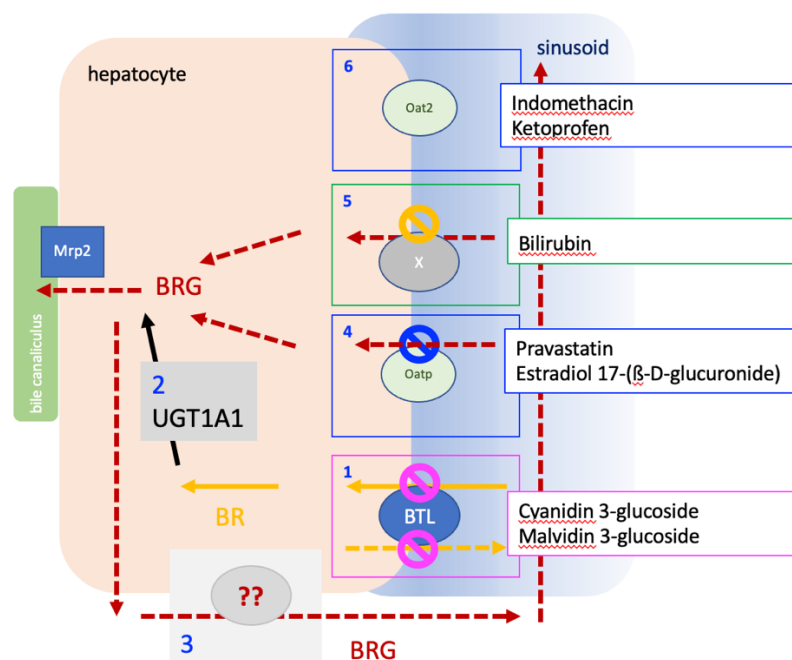
Questi dati mostrano l'applicabilità del test HUG per l'analisi simultanea dei tre principali pigmenti biliari in orate, che richiede solo 150 μ L di siero. I risultati ottenuti, insieme a quelli ottenuti precedentemente nel sangue di ratto e sue frazioni, possono essere utili per l'analisi di campioni clinici. Questo semplice metodo può essere sostituito ai laboriosi metodi tradizionali utilizzati nei laboratori di analisi.

Conclusioni

La principale novità metodologica di questo studio deriva dall'utilizzo di un'analisi fluorimetrica altamente sensibile e selettiva per la quantificazione di BR (Bandiera et al. 2020). Questo metodo ha consentito di utilizzare diverse condizioni sperimentali favorevoli, come la somministrazione di una bassa dose di BR in una soluzione priva di albumina e l'analisi di concentrazioni nM di BR e BRG nell'effluente di perfusione, senza interferenza da parte di altri inibitori co-iniettati. Ciò ha permesso di testare l'attività di 4 composti naturali (tre antociani e il *trans*-resveratrolo) e di 4 farmaci (pravastatina, E17G, indometacina e ketoprofene) sull'assorbimento epatico sia di BR che di BRG.

Tuttavia, gli esperimenti sul fegato sono stati efficienti grazie alle prove preliminari sull'assorbimento della bilirubina realizzati nelle cellule SH-SY5Y ed HepG2, che hanno dimostrato che anche in queste linee cellulari esiste un meccanismo di trasporto della bilirubina, mostrando sensibilità all'effetto inibitorio di C3G, seppur con grandi variazioni.

In questo studio mostriamo che C3G ha inibito selettivamente l'assorbimento di BR mediante una modalità concentrazione-dipendente, senza alcun effetto diretto sull'assorbimento di BRG (Schema 1).



Schema 1. Vie di trasporto di membrana per la captazione epatica di bilirubina e bilirubina glucuronide. La bilitranslocasi (BTL) catalizza l'assorbimento della bilirubina (BR, freccia gialla), che è inibita dalla cianidina 3-glucoside e malvidina 3-glucoside (1). L'enzima UGT1A1 media la reazione di glucuronidazione del BR, formando bilirubina glucuronide (BRG) (2). Una via molecolare sconosciuta determina l'efflusso di una piccola frazione di BRG (freccia rossa) dal fegato alla sinusoide (3). I trasportatori Oatp1b2 catalizzano l'assorbimento selettivo sinusoidale di BRG, che è inibito da pravastatina, estradiolo 17-(β -D-glucuronide) (4). Il BRG è captato da un trasportatore sconosciuto, che è inibito da alte concentrazioni di BR, innescate dall'inibizione della bilitranslocasi da parte della cianidina 3-glucoside (5). L'indometacina e il ketoprofene, substrati di Oat2, non inibiscono l'assorbimento di BR o BRG (6).

In questo studio, mostriamo che 5 composti (cioè pravastatina, E17G, indometacina, ketoprofene e *trans*-resveratrolo) agiscono come substrati o inibitori dei trasportatori di membrana sinusoidali appartenenti alle famiglie SLCO (Oatp), SLC22 (Oat) e SLC51 (trasportatore di molecole derivate da steroidi, Ost), ma inattivi sull'attività di trasporto di BTL (Župerl et al. 2011) e quindi sull'assorbimento epatico di BR. Piuttosto, due di loro (pravastatina e E17G) hanno inibito la ricaptazione di BRG, mostrando la loro specifica inibizione su Oatp.

Co-iniettato BR con C3G si sono attivati due picchi simultanei di BR e BRG. Ciò indica che l'aumento della concentrazione sinusoidale di BR, fungeva da effettore per l'inibizione di un

trasportatore di BRG. Quindi, abbiamo ipotizzato che questo trasportatore BRG potrebbe essere Oat2, abbiamo quindi testato due suoi substrati: indometacina e ketoprofene (Naomi Morita et al. 2005), che hanno, però, mostrato di essere inattivi sull'assorbimento di BR o BRG nel nostro modello, respingendo la nostra ipotesi. Si potrebbe ipotizzare che il trasportatore BRG inibito da BR fosse Oatp, poiché sia OATP1B1 che OATP1B3 trasportano il verde di indocianina (de Graaf et al. 2011). Tuttavia, OATP1B1 è inibito dal glicocolato (Moynihan 1966). Pertanto, il trasporto epatico di BRG sembra avvenire attraverso due vie principali, che sono inibite da alcuni comuni substrati dei trasportatori degli acidi biliari (BSP, verde di indocianina e tauro/glicocolato) o BR, rispettivamente. Non ci sono dati in letteratura sulla natura di questo putativo trasportatore BRG sinusoidale. Un doppio sistema per l'assorbimento sinusoidale di BRG è indicativo di un'importanza fisiologica di alto livello di questo processo. In condizioni di iperbilirubinemia (acuta), l'inibizione della ricaptazione di BRG potrebbe essere fondamentale per limitare la concentrazione intracellulare di BRG, che può causare l'inibizione del prodotto di UGT1A1 e in definitiva limitare la capacità di ricaptazione di BR del fegato. Questo sistema può svolgere un ruolo di primo piano nella fase neonatale, quando il tasso di produzione di bilirubina è superiore al tasso di escrezione epatica, con grave iperbilirubinemia e rischio di ittero.

Dopo l'analisi effettuate sul fegato isolato e perfuso, in questo progetto di tesi si è deciso di studiare anche l'applicabilità del metodo BR-HUG, mediante l'analisi su diverse frazioni di sangue di ratto e di pesce. È stato possibile confrontare i valori ottenuti nel siero o nel plasma con i valori ottenute dal saggio HUG eseguito direttamente nel campione di sangue, corretto per il valore dell'ematocrito. In questo modo è stato possibile valutare se vi fossero discrepanze dovute alla preparazione del campione. Si è osservata una forte correlazione, confermando l'ampia applicabilità del test. Inoltre, è stato possibile analizzare anche la biliverdina in campioni di pesce. La possibilità di eseguire il test direttamente nel sangue intero può semplificare notevolmente la gestione dei campioni, inoltre la raccolta non invasiva di un piccolo volume di sangue capillare potrebbe consentire lo screening della bilirubina in studi di farmacocinetica. Questo semplice dosaggio potrebbe essere sfruttato per l'analisi delle fluttuazioni della bilirubina libera, coniugata e biliverdina nel tempo in diverse specie animali, consentendo la valutazione di questo parametro in base a diversi trattamenti (utilizzo di farmaci o composti naturali), condizioni patologiche o stili di vita, associati magari ad una diversa dieta alimentare, senza ricorrere all'utilizzo dei complessi metodi tradizionali (come per esempio la diazoreazione).

Discussione generale

In questo progetto di tesi è stato studiato l'effetto inibitorio della cianidina 3-glucoside sull'uptake della bilirubina.

La C3G è un antociano che si trovano soprattutto nel vino rosso, ma anche in certe varietà di cereali e di ortaggi (melanzane, cavolo, fagioli, cipolle, rafani); inoltre è particolarmente abbondante nella frutta in generale. Il contenuto di cianidina è generalmente proporzionale all'intensità di colore e raggiungono valori fino a 2-4 g/kg di peso fresco nel ribes e nelle more. Questi valori aumentano man mano che il frutto matura. Gli antociani si trovano principalmente nella buccia, eccetto che in certi tipi di frutta rossa nei quali sono presenti nella polpa (ciliegie e fragole). Il vino contiene circa 200-350 mg di antociani/L, che possono trasformarsi in strutture più complesse conformemente all'invecchiare del vino.

Per valutare l'efficacia dell'uptake è stata studiata la bilirubina, essa è il prodotto del catabolismo dell'eme che si verifica in tutte le cellule, con il maggior contributo proveniente dai macrofagi splenici coinvolti nel turnover degli eritrociti senescenti. La bilirubina (BR) circola nel sangue come complesso reversibile con l'albumina sierica. Viene selettivamente assorbito nel fegato, metabolizzato ed escreto nella bile come bilirubina glucuronide (BRG) (D. Levitt e Levitt 2014).

Il(i) trasportatore(i) di membrana per l'assorbimento di BR epatico è ancora sconosciuto (Čvorović e Passamonti 2017). Sia nei ratti che nell'uomo, non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra l'inibizione indotta da farmaci dei trasportatori epatici SLCO1B1 e 1B3 (OATP1B1 e OATP1B) e l'iperbilirubinemia (Kotsampasakou, Escher, e Ecker 2017), probabilmente a causa della partecipazione di diversi fattori aggiuntivi nell'intero organismo.

Per questo motivo è stato necessario utilizzare un modello semplificato per lo studio della funzionalità epatica, ovvero il fegato di ratto isolato e perfuso, che presenta il vantaggio di un'architettura completamente intatta, preservando la caratteristica critica del flusso biliare (Stieger, Mahdi, e Jäger 2017), consentendo allo stesso tempo il controllo delle condizioni di perfusione epatica, compresa la somministrazione dei composti in esame.

Abbiamo sviluppato un protocollo per l'analisi di più eventi (fino a 12) di captazione di BR nel modello di fegato isolato e perfuso standard (Bessemers et al. 2006), mediante iniezioni portali

ripetute di boli di BR, in una finestra temporale di circa 25 minuti. La presenza di BR e BRG è stata analizzata nell'effluente epatico mediante un metodo fluorimetrico (Bandiera et al. 2020 con adattamenti).

Questo protocollo offre il vantaggio di produrre fino a 12 osservazioni ripetute di eventi di assorbimento di BR nella stessa preparazione di fegato isolato e perfuso, offrendo ampie opportunità di schermare le molecole per il loro potenziale di inibire i trasportatori di membrana BR e BRG epatici.

Attualmente ci sono prove scarse in letteratura che descrivono la relazione meccanicistica tra i flavonoidi alimentari, come la cianidina 3-glucoside, e il miglioramento della funzione cognitiva. Con questa tesi, abbiamo condotto con successo uno studio integrato multilivello che ha fissato le condizioni preliminari per un futuro studio di farmacocinetica per riuscire ad osservare l'attività neuroprotettiva della cianidina 3-glucoside in esperimenti in vivo. Inoltre, questi dati sono stati importanti per la progettazione di un futuro studio di sperimentazione animale, volto a stabilire il legame tra l'assunzione di alimenti/nutraceutici ricchi di antociani e la protezione contro le disfunzioni cognitive legate all'età.

I risultati presentati in questa tesi potrebbero anche definire i motivi per cui può essere vantaggioso utilizzare una dieta ricca di flavonoidi dietetici puri come prodotti nutraceutici capaci di determinare un'azione neuroprotettiva nella popolazione sana. Questo approccio preventivo potrebbe essere anche utilizzato per prevenire le malattie indotte da stress ossidativo. In definitiva, gli esperimenti avranno un impatto sulla società contribuendo, mediante nuove conoscenze, nella progettazione di linee guida dietetiche raccomandate per un sano invecchiamento cerebrale.

Bibliografia

- Aarsland, Dag, Kjeld Andersen, Jan Petter Larsen, Robert Perry, Tore Wentzel-Larsen, Anette Lolk, e Per Kragh-Sørensen. 2004. «The Rate of Cognitive Decline in Parkinson Disease». *Archives of Neurology* 61 (12). <https://doi.org/10.1001/archneur.61.12.1906>.
- Adachi, Yukihiro, Jayanta Roy-chowdhury, Namita Roy-chowdhury, Rolf Kinne, Thao Tran, Hiroaki Kobayashi, e Irwin M. Arias. 1990. «Hepatic Uptake of Bilirubin Diglucuronide: Analysis by Using Sinusoidal Plasma Membrane Vesicles». *Journal of Biochemistry* 107 (5): 749–54. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123120>.
- Aguiar, Carlos Clayton Torres, Anália Barbosa Almeida, Paulo Victor Pontes Araújo, Rita Neuma Dantas Cavalcante de Abreu, Edna Maria Camelo Chaves, Otoni Cardoso do Vale, Danielle Silveira Macêdo, David John Woods, Marta Maria de França Fonteles, e Silvania Maria Mendes Vasconcelos. 2012. «Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/795259>.
- Aguilar-Salinas, C. A., H. Barrett, e G. Schonfeld. 1998. «Metabolic Modes of Action of the Statins in the Hyperlipoproteinemias». *Atherosclerosis* 141 (2): 203–7. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(98\)00198-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(98)00198-1).
- Ahdab-Barmada, M., J. Moossy, E. M. Nemoto, e M. R. Lin. 1986. «Hyperoxia Produces Neuronal Necrosis in the Rat». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 45 (3): 233–46.
- Ahmed, I., M. S. Attia, N. Ahmad, J. P. Lodge, e D. J. Potts. 2001. «Use of Isolated Perfused Rat Liver Model for Testing Liver Preservation Solutions». *Transplantation Proceedings* 33 (7–8): 3709–11. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(01\)02513-1](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(01)02513-1).
- Akita, Hidetaka, Hiroshi Suzuki, Tomoko Hirohashi, Hajime Takikawa, e Yuichi Sugiyama. 2002. «Transport Activity of Human MRP3 Expressed in Sf9 Cells: Comparative Studies with Rat MRP3». *Pharmaceutical Research* 19 (1): 34–41. <https://doi.org/10.1023/a:1013699130991>.
- Albarracín, Sonia Luz, Ben Stab, Zulma Casas, Jhon Jairo Sutachan, Ismael Samudio, Janneth Gonzalez, Luis Gonzalo, Francisco Capani, Ludis Morales, e George E. Barreto. 2012. «Effects of Natural Antioxidants in Neurodegenerative Disease». *Nutritional Neuroscience* 15 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.00000000028>.
- Ali, Hussein M., Wafaa Almagribi, e Mona N. Al-Rashidi. 2016. «Antiradical and Reductant Activities of Anthocyanidins and Anthocyanins, Structure–Activity Relationship and Synthesis». *Food Chemistry* 194 (marzo): 1275–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.003>.
- Ameri, M., Schnaars, H., Sibley, J., & Honor, D. (2011). Comparison of the vanadate oxidase method with the diazo method for serum bilirubin determination in dog, monkey, and

- rat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 120–123. <https://doi.org/10.1177/104063871102300121>.
- Amini, Shohreh, e Martyn K. White, a c. di. 2013. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5>.
- Andersen, Ø M., e K. R. Markham. 2006. «Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.» *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063011821>.
- Andersen, Øyvind, e Monica Jordheim. 2013. «Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Source. In: Anthocyanins in Health and Disease». In , 13–90.
- Androutsopoulos, Vasilis P., e Demetrios A. Spandidos. 2013. «The Flavonoids Diosmetin and Luteolin Exert Synergistic Cytostatic Effects in Human Hepatoma HepG2 Cells via CYP1A-Catalyzed Metabolism, Activation of JNK and ERK and P53/P21 up-Regulation». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (2): 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.01.012>.
- Arai, Toshiyuki, Yasunobu Yoshikai, Junichi Kamiya, Masato Nagino, Katsuhiko Uesaka, Norihiro Yuasa, Koji Oda, Tsuyoshi Sano, e Yuji Nimura. 2001. «Bilirubin Impairs Bactericidal Activity of Neutrophils through an Antioxidant Mechanism in Vitro». *Journal of Surgical Research* 96 (1): 107–13. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.6061>.
- Asad, S. F., S. Singh, A. Ahmad, N. U. Khan, e S. M. Hadi. 2001. «Prooxidant and Antioxidant Activities of Bilirubin and Its Metabolic Precursor Biliverdin: A Structure-Activity Study». *Chemico-Biological Interactions* 137 (1): 59–74. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(01\)00209-5](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(01)00209-5).
- Aycicek, Ali, e Ozcan Erel. 2007. «Total Oxidant/Antioxidant Status in Jaundiced Newborns before and after Phototherapy». *Jornal De Pediatria* 83 (4): 319–22. <https://doi.org/10.2223/JPED.1645>.
- Baldini, G., S. Passamonti, G. C. Lunazzi, C. Tiribelli, e G. L. Sottocasa. 1986. «Cellular Localization of Sulfobromophthalein Transport Activity in Rat Liver». *Biochimica Et Biophysica Acta* 856 (1): 1–10. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90002-7).
- Bandiera, Antonella. 2011. «Transglutaminase-catalyzed preparation of human elastin-like polypeptide-based three-dimensional matrices for cell encapsulation». *Enzyme and microbial technology* 49 (settembre): 347–52. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2011.06.012>.
- Bandiera, Antonella, Lucia Corich, Silvia Tommasi, Marco De Bortoli, Paola Pelizzo, Marco Stebel, Dino Paladin, e Sabina Passamonti. 2020. «Human Elastin-like Polypeptides as a Versatile Platform for Exploitation of Ultrasensitive Bilirubin Detection by UnaG». *Biotechnology and Bioengineering* 117 (2): 354–61. <https://doi.org/10.1002/bit.27217>.
- Bandiera, Antonella, Paola Sist, e Ranieri Urbani. 2010. «Comparison of Thermal Behavior of Two Recombinantly Expressed Human Elastin-like Polypeptides for Cell Culture

- Bandiera, Antonella, Anna Taglienti, Fulvio Micali, Bianca Pani, Marisa Tamaro, Vittorio Crescenzi, e Giorgio Manzini. 2006. «Expression and characterization of human-elastin-repeat-based temperature-responsive protein polymers for biotechnological purposes». *Biotechnology and applied biochemistry* 42 (gennaio): 247–56. <https://doi.org/10.1042/BA20050114>.
- Barañano, David E., Mahil Rao, Christopher D. Ferris, e Solomon H. Snyder. 2002. «Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25): 16093–98. <https://doi.org/10.1073/pnas.252626999>.
- Barbero, Nadia, Claudia Barolo, e Guido Viscardi. s.d. «Bovine Serum Albumin Bioconjugation with FITC». *World Journal of Chemical Education*, 6.
- Barone E, Trombino S, Cassano R, Sgambato A, De Paola B, Di Stasio E, Picci N, Preziosi P, Mancuso C. Characterization of the S-denitrosylating activity of bilirubin. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug;13(8B):2365-75. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00680.x.
- Basli, Abdelkader, Stéphanie Soulet, Nassima Chaher, Jean-Michel Mérillon, Mohamed Chibane, Jean-Pierre Monti, e Tristan Richard. 2012. «Wine Polyphenols: Potential Agents in Neuroprotection». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012: 1–14. <https://doi.org/10.1155/2012/805762>.
- Battiston, L, A Macagno, S Passamonti, F Micali, e G L Sottocasa. 1999. «Specific sequence-directed anti-biliverdin antibodies as a tool to detect potentially bilirubin-binding proteins in different tissues of the rat». *FEBS Lett* 453 (3): 351–55.
- Battiston, L, S Passamonti, A Macagno, e G L Sottocasa. 1998. «The Bilirubin-Binding Motif of Biliverdin Reductase and Its Relation to Conserved Motifs in Ancient Biliproteins.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247 (3): 687–92. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8868>.
- Battiston, Lucia, Sabina Passamonti, Annalisa Macagno, e Gian Luigi Sottocasa. 1998. «The Bilirubin-Binding Motif of Biliverdin Reductase and Its Relation to Conserved Motifs in Ancient Biliproteins». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247 (3): 687–92. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8868>.
- Bento da Cunha, Renata Filipa. 2018. «SET UP OF AN ASSAY TO DETECT BILIRUBIN IN CELL CULTURES. Erasmus + report.»
- Berk, P. D., J. R. Bloomer, R. B. Howe, e N. I. Berlin. 1970. «Constitutional Hepatic Dysfunction (Gilbert's Syndrome). A New Definition Based on Kinetic Studies with Unconjugated Radiobilirubin». *The American Journal of Medicine* 49 (3): 296–305. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(70\)80020-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(70)80020-1).
- Berk, Paul D., Robert B. Howe, Joseph R. Bloomer, e Nathaniel I. Berlin. 1969. «Studies of Bilirubin Kinetics in Normal Adults». *Journal of Clinical Investigation* 48 (11): 2176–

90. <https://doi.org/10.1172/JCI106184>.
- «BERNE & LEVY PHYSIOLOGY 7th EDITION PDF FREE DOWNLOAD»: 2018. *Medical Students Corner* (blog). 20 marzo 2018. <https://medstudentscorner.com/berne-and-levy-physiology-7th-edition-pdf-free-download/>.
- Bessems, M, N Hart, Rene Tolba, B Doorschodt, Henri Leuvenink, Rutger Ploeg, Thomas Minor, e T Gulik. 2006. «The isolated perfused rat liver: Standardization of a time-honoured model». *Laboratory animals* 40 (agosto): 236–46. <https://doi.org/10.1258/002367706777611460>.
- Bin-Nun, Alona, Francis B. Mimouni, Yair Kasirer, Irina Schors, Michael S. Schimmel, Michael Kaplan, e Cathy Hammerman. 2018. «Might Bilirubin Serve as a Natural Antioxidant in Response to Neonatal Encephalopathy?» *American Journal of Perinatology* 35 (11): 1107–12. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1641746>.
- Blennow, Kaj, Mony J. de Leon, e Henrik Zetterberg. 2006. «Alzheimer's Disease». *Lancet (London, England)* 368 (9533): 387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7).
- Bonen, Arend, Miriam Heynen, e Hideo Hatta. 2006. «Distribution of Monocarboxylate Transporters MCT1-MCT8 in Rat Tissues and Human Skeletal Muscle». *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 31 (1): 31–39. <https://doi.org/10.1139/h05-002>.
- Bonnett, Raymond, John E. Davies, e Michael B. Hursthouse. 1976. «Structure of Bilirubin». *Nature* 262 (5566): 326–28. <https://doi.org/10.1038/262326a0>.
- Bornsek, Spela Moze, Lovro Ziberna, Tomaz Polak, Andreja Vanzo, Natasa Poklar Ulrih, Veronika Abram, Federica Tramer, e Sabina Passamonti. 2012. «Bilberry and Blueberry Anthocyanins Act as Powerful Intracellular Antioxidants in Mammalian Cells». *Food Chemistry* 134 (4): 1878–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.092>.
- Bors, Wolf, Christa Michel, e Kurt Stettmaier. 2001. «Structure-Activity Relationships Governing Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols». In *Methods in Enzymology*, 335:166–80. Flavonoids and Other Polyphenols. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)35241-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)35241-2).
- Bosma, Piter J., Jayanta Roy Chowdhury, Conny Bakker, Shailaja Gantla, Anita de Boer, Ben A. Oostra, Dick Lindhout, et al. 1995. «The Genetic Basis of the Reduced Expression of Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome». *New England Journal of Medicine* 333 (18): 1171–75. <https://doi.org/10.1056/NEJM199511023331802>.
- Boveris, Alberto, Nozomu Oshino, e Britton Chance. 1972. «The Cellular Production of Hydrogen Peroxide». *Biochemical Journal* 128 (3): 617–30. <https://doi.org/10.1042/bj1280617>.
- Bradford, B U, M Marotto, J J Lemasters, e R G Thurman. 1986. «New, simple models to

- evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state.» *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 236 (1): 263–68.
- Braslavsky, Silvia E., Dagmar Schneider, Klaus Heihoff, Santiago Nonell, Pedro F. Aramendia, e Kurt Schaffner. 1991. «Phytochrome models. 11. Photophysics and photochemistry of phycocyanobilin dimethyl ester». *Journal of the American Chemical Society* 113 (19): 7322–34. <https://doi.org/10.1021/ja00019a033>.
- Bravo, Laura. 1998. «Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance». *Nutrition Reviews* 56 (11): 317–33. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>.
- Briz, Oscar, Maria A. Serrano, Rocio I. R. Macias, Javier Gonzalez-Gallego, e Jose J. G. Marin. 2003. «Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the Human Placenta-Maternal Liver Tandem Excretory Pathway for Foetal Bilirubin». *Biochemical Journal* 371 (3): 897–905. <https://doi.org/10.1042/bj20030034>.
- Brodersen, R., e L. Stern. 1990. «Deposition of Bilirubin Acid in the Central Nervous System-a Hypothesis for the Development of Kernicterus». *Acta Paediatrica Scandinavica* 79 (1): 12–19. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1990.tb11323.x>.
- Calabrese, Vittorio, Carolin Cornelius, Albena T. Dinkova-Kostova, Ivo Iavicoli, Rosanna Di Paola, Aleardo Koverech, Salvatore Cuzzocrea, Enrico Rizzarelli, e Edward J. Calabrese. 2012. «Cellular Stress Responses, Hormetic Phytochemicals and Vitagenes in Aging and Longevity». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822 (5): 753–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.002>.
- Calligaris, S. D., Bellarosa, C., Giraudi, P., Wennberg, R. P., Ostrow, J. D., & Tiribelli, C. (2007). Cytotoxicity is predicted by unbound and not total bilirubin concentration. *Pediatric Research*, 62(5), 576–580. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181568c94>.
- Chan, Tom S., Shamir Cassim, Valérie-Ann Raymond, Sven Gottschalk, Grégory Merlen, Claudia Zwingmann, Pascal Lapierre, Peter Darby, Cyril David Mazer, e Marc Bilodeau. 2018. «Upregulation of Krebs Cycle and Anaerobic Glycolysis Activity Early after Onset of Liver Ischemia». *PLOS ONE* 13 (6): e0199177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199177>.
- Chan, Xiaoxi. 2014. «The Interactions of Herbal Compounds with Human Organic Anion/Cation Transporters». *Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics* 05 (gennaio). <https://doi.org/10.4172/2153-0645.1000142>.
- Chen, Hai, Hideyuki Yoshioka, Gab Seok Kim, Joo Eun Jung, Nobuya Okami, Hiroyuki Sakata, Carolina M. Maier, Purnima Narasimhan, Christina E. Goeders, e Pak H. Chan. 2011. «Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection». *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (8): 1505–17. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3576>.
- Chiu, Hawjyh, Jennie A. Brittingham, e Debra L. Laskin. 2002. «Differential Induction of

- Heme Oxygenase-1 in Macrophages and Hepatocytes during Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in the Rat: Effects of Hemin and Biliverdin». *Toxicology and Applied Pharmacology* 181 (2): 106–15. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9409>.
- Choudhury, Amrita Roy, Emilia Sikorska, Johannes van den Boom, Peter Bayer, Łukasz Popenda, Kosma Szutkowski, Stefan Jurga, Massimiliano Bonomi, Andrej Sali, Igor Zhukov, et al. 2015. «Structural Model of the Bilirubin Translocase Transmembrane Domain Supported by NMR and FRET Data». *PLoS ONE* 10 (8): e0135455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135455>.
- Ciofani, Gianni, Giada Graziana Genchi, Virgilio Mattoli, Barbara Mazzolai, e Antonella Bandiera. 2014. «The potential of recombinant human elastin-like polypeptides for drug delivery». *Expert Opinion on Drug Delivery* 11 (10): 1507–12. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.926885>.
- Clark, James E., Roberta Foresti, Padmini Sarathchandra, Harparkash Kaur, Colin J. Green, e Roberto Motterlini. 2000. «Heme Oxygenase-1-Derived Bilirubin Ameliorates Postischemic Myocardial Dysfunction». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 278 (2): H643–51. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.2.H643>.
- Clifford, Michael N. 2000. «Anthocyanins – Nature, Occurrence and Dietary Burden». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (7): 1063–72. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q).
- Commenges, D, V Scotet, S Renaud, H Jacqmin-Gadda, e P Barberger-Gateau. s.d. «Intake of Flavonoids and Risk of Dementia», 7.
- Conn, Harold O., e Johan Fevery. 1987. «Bile Pigments and Jaundice: Molecular, Metabolic and Medical Aspects. Edited by J. Donald Ostrow. 744 Pp. New York: Marcel Dekker, Inc., 1986. \$119.50». *Hepatology* 7 (5): 985–985. <https://doi.org/10.1002/hep.1840070540>.
- Crunkhorn, Sarah. 2012. «Rescuing Protein Homeostasis». *Nature Reviews Drug Discovery* 11 (2): 105–105. <https://doi.org/10.1038/nrd3662>.
- Cui, Yunhai, Jörg König, Inka Leier, Ulrike Buchholz, e Dietrich Keppler. 2001. «Hepatic Uptake of Bilirubin and Its Conjugates by the Human Organic Anion Transporter SLC21A6». *Journal of Biological Chemistry* 276 (13): 9626–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004968200>.
- Čvorović, Jovana, e Sabina Passamonti. 2017. «Membrane Transporters for Bilirubin and Its Conjugates: A Systematic Review». *Frontiers in Pharmacology*.
- Czank, Charles, Aedín Cassidy, Qingzhi Zhang, Douglas J Morrison, Tom Preston, Paul A Kroon, Nigel P Botting, e Colin D Kay. 2013. «Human Metabolism and Elimination of the Anthocyanin, Cyanidin-3-Glucoside: A ¹³C-Tracer Study». *The American Journal of Clinical Nutrition* 97 (5): 995–1003. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.049247>.

- Dajas, Federico, Felicia Rivera, Fernanda Blasina, Florencia Arredondo, Carolina Echeverry, Laura Lafon, Andrea Morquio, e Horacio Heizen. 2003. «Cell Culture Protection Andin Vivo Neuroprotective Capacity of Flavonoids». *Neurotoxicity Research* 5 (6): 425–32. <https://doi.org/10.1007/BF03033172>.
- Danilov, Camelia A., e Gary Fiskum. 2008. «Hyperoxia Promotes Astrocyte Cell Death after Oxygen and Glucose Deprivation». *Glia* 56 (7): 801–8. <https://doi.org/10.1002/glia.20655>.
- Day, Andrea J, F.Javier Cañada, Juan C Díaz, Paul A Kroon, Russell Mclauchlan, Craig B Faulds, Geoff W Plumb, Michael R.A Morgan, e Gary Williamson. 2000. «Dietary Flavonoid and Isoflavone Glycosides Are Hydrolysed by the Lactase Site of Lactase Phlorizin Hydrolase». *FEBS Letters* 468 (2–3): 166–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01211-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01211-4).
- Del Rio, Daniele, Gina Borges, e Alan Crozier. 2010. «Berry Flavonoids and Phenolics: Bioavailability and Evidence of Protective Effects». *British Journal of Nutrition* 104 (S3): S67–90. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003958>.
- Di Giacomo, Claudia, Rosaria Acquaviva, Rosa Santangelo, Valeria Sorrenti, Luca Vanella, Giovanni Li Volti, Nicolantonio D’Orazio, Angelo Vanella, e Fabio Galvano. 2012. «Effect of Treatment with Cyanidin-3-O- β -D-Glucoside on Rat Ischemic/Reperfusion Brain Damage». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/285750>.
- Díaz-Reval, María Irene, Rosa Ventura-Martínez, Myrna Déciga-Campos, José A Terrón, Francesc Cabré, e Francisco Javier López-Muñoz. 2004. «Evidence for a Central Mechanism of Action of S-(+)-Ketoprofen». *European Journal of Pharmacology* 483 (2): 241–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.10.036>.
- Dolermo, Cecilia. 2017. «REALIZZAZIONE DI UN RECETTORE INGEGNERIZZATO PER IL RILEVAMENTO DELLA BILIRUBINA. Tesi di laurea I livello.»
- Dore, S., M. Takahashi, C. D. Ferris, L. D. Hester, D. Guastella, e S. H. Snyder. 1999. «Bilirubin, Formed by Activation of Heme Oxygenase-2, Protects Neurons against Oxidative Stress Injury». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (5): 2445–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2445>.
- Dröge, Wulf. 2002. «Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function». *Physiological Reviews* 82 (1): 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- Duchowicz, Pablo R., Nicolás A. Szewczuk, e Alicia B. Pomilio. 2019. «QSAR Studies of the Antioxidant Activity of Anthocyanins». *Journal of Food Science and Technology* 56 (12): 5518–30. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04024-w>.
- Dufour, Claire, e Olivier Dangles. 2005. «Flavonoid–Serum Albumin Complexation: Determination of Binding Constants and Binding Sites by Fluorescence Spectroscopy». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1721 (1–3): 164–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.10.013>.

- Echeverry, Carolina, Florencia Arredondo, Juan Andres Abin-Carriquiry, Jacob Ogwenó Midíwo, Charles Ochieng, Leonidah Kerubo, e Federico Dajas. 2010. «Pretreatment with Natural Flavones and Neuronal Cell Survival after Oxidative Stress: A Structure–Activity Relationship Study». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (4): 2111–15. <https://doi.org/10.1021/jf902951v>.
- El Mohsen, Manal Abd, Joanne Marks, Gunter Kuhnle, Kevin Moore, Edward Debnam, S. Kaila Srai, Catherine Rice-Evans, e Jeremy P. E. Spencer. 2006. «Absorption, Tissue Distribution and Excretion of Pelargonidin and Its Metabolites Following Oral Administration to Rats». *British Journal of Nutrition* 95 (1): 51–58. <https://doi.org/10.1079/BJN20051596>.
- Elias, M. M., G. C. Lunazzi, S. Passamonti, B. Gazzin, M. Miccio, G. Stanta, G. L. Sottocasa, e C. Tiribelli. 1990. «Bilitranslocase localization and function in basolateral plasma membrane of renal proximal tubule in rat». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 259 (4): F559–64. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.259.4.F559>.
- Eraly, S. 2008. «Organic Anion Transporter 3 Inhibitors as Potential Novel Antihypertensives☆». *Pharmacological Research* 58 (5–6): 257–61. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.09.013>.
- Fang, Lee-Shing, e Jeffrey L. Bada. 1990. «The Blue-Green Blood Plasma of Marine Fish». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 97 (1): 37–45. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90174-R](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90174-R).
- Faria, Ana, Diogo Pestana, Diana Teixeira, Joana Azevedo, Victor Freitas, Nuno Mateus, e Conceição Calhau. 2010. «Flavonoid Transport across RBE4 Cells: A Blood-Brain Barrier Model». *Cellular and Molecular Biology Letters* 15 (2). <https://doi.org/10.2478/s11658-010-0006-4>.
- Farina, Marcelo, Daiana Silva Avila, João Batista Teixeira da Rocha, e Michael Aschner. 2013. «Metals, Oxidative Stress and Neurodegeneration: A Focus on Iron, Manganese and Mercury». *Neurochemistry International* 62 (5): 575–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.006>.
- Fereshtehnejad, Seyed Mohammad, Karim Poorsattar Bejeh Mir, Arash Poorsattar Bejeh Mir, e Parisa Mohagheghi. 2012. «Evaluation of the Possible Antioxidative Role of Bilirubin Protecting from Free Radical Related Illnesses in Neonates». *Acta Medica Iranica* 50 (3): 153–63.
- Ferrars, R M de, C Czank, Q Zhang, N P Botting, P A Kroon, A Cassidy, e C D Kay. 2014. «The Pharmacokinetics of Anthocyanins and Their Metabolites in Humans: Pharmacokinetics of a ¹³ C-Labelled Anthocyanin». *British Journal of Pharmacology* 171 (13): 3268–82. <https://doi.org/10.1111/bph.12676>.
- Ferrigno, Andrea, Laura G Di Pasqua, Clarissa Berardo, Veronica Siciliano, Plinio Richelmi, e Mariapia Vairetti. 2017. «Oxygen Tension-Independent Protection against Hypoxic Cell Killing in Rat Liver by Low Sodium.» *European Journal of Histochemistry : EJH* 61 (2): 2798. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2798>.

- Filho, Wilson, Caio Lima, Marcos Paunksnis, Ariana Silva, Mauro Perilhão, Marina Caldeira, Danilo Bocalini, e Romeu Souza. 2017. «Reference database of hematological parameters for growing and aging rats». *The Aging Male* 21 (luglio): 1–4. <https://doi.org/10.1080/13685538.2017.1350156>.
- Folbergrová, Jaroslava, Jakub Otáhal, e Rastislav Druga. 2012. «Brain Superoxide Anion Formation in Immature Rats during Seizures: Protection by Selected Compounds». *Experimental Neurology* 233 (1): 421–29. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.009>.
- Foresti, Roberta, Martha Hoque, Sandip Bains, Colin J. Green, e Roberto Motterlini. 2003. «Haem and Nitric Oxide: Synergism in the Modulation of the Endothelial Haem Oxygenase-1 Pathway». *Biochemical Journal* 372 (2): 381–90. <https://doi.org/10.1042/bj20021516>.
- Fornasaro, Stefano, Lovro Ziberna, Mattia Gasperotti, Federica Tramer, Urška Vrhovšek, Fulvio Mattivi, e Sabina Passamonti. 2016. «Determination of Cyanidin 3-Glucoside in Rat Brain, Liver and Kidneys by UPLC/MS-MS and Its Application to a Short-Term Pharmacokinetic Study». *Scientific Reports* 6 (marzo): 22815. <https://doi.org/10.1038/srep22815>.
- Frandsen, P. C., e R. Brodersen. 1986. «Bilirubin/Rat Serum Albumin Interaction». *Acta Chemica Scandinavica. Series B: Organic Chemistry and Biochemistry* 40 (1): 55–59. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.40b-0055>.
- Frisoni, G. B., M. Bocchetta, G. Chetelat, G. D. Rabinovici, M. J. de Leon, J. Kaye, E. M. Reiman, et al. 2013. «Imaging Markers for Alzheimer Disease: Which vs How». *Neurology* 81 (5): 487–500. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31829d86e8>.
- Fujiwara, Ryoichi, Mathias Haag, Elke Schaeffeler, Anne T. Nies, Ulrich M. Zanger, e Matthias Schwab. 2018. «Systemic Regulation of Bilirubin Homeostasis: Potential Benefits of Hyperbilirubinemia». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67 (4): 1609–19. <https://doi.org/10.1002/hep.29599>.
- Gandhi, Sonia, e Andrey Y. Abramov. 2012. «Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>.
- Gandy, Sam, e Steven T. DeKosky. 2013. «Toward the Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease: Rational Strategies and Recent Progress». *Annual Review of Medicine* 64 (1): 367–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-092611-084441>.
- Gao, X., A. Cassidy, M. A. Schwarzschild, E. B. Rimm, e A. Ascherio. 2012. «Habitual Intake of Dietary Flavonoids and Risk of Parkinson Disease». *Neurology* 78 (15): 1138–45. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824f7fc4>.
- Gazzin, Silvia, Flora Masutti, Libor Vitek, e Claudio Tiribelli. 2017. «The Molecular Basis of Jaundice: An Old Symptom Revisited». *Liver International* 37 (8): 1094–1102. <https://doi.org/10.1111/liv.13351>.

- Gazzin, Silvia, Libor Vitek, Jon Watchko, Steven M. Shapiro, e Claudio Tiribelli. 2016. «A Novel Perspective on the Biology of Bilirubin in Health and Disease». *Trends in Molecular Medicine* 22 (9): 758–68. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.07.004>.
- Gennuso, Florinda, Cristina Ferneti, Cataldo Tirolo, Nuccio Testa, Francesca L'Episcopo, Salvo Caniglia, Maria Concetta Morale, et al. s.d. «Bilirubin Protects Astrocytes from Its Own Toxicity by Inducing Up-Regulation and Translocation of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (Mrp1)». *MEDICAL SCIENCES*, 6.
- Gentile, S, M Persico, e C Tiribelli. 1990. «Abnormal Hepatic Uptake of Low Doses of Sulfbromophthalein in Gilbert's Syndrome: The Role of Reduced Affinity of the Plasma Membrane Carrier of Organic Anions.» *Hepatology (Baltimore, Md.)* 12 (2): 213–17.
- Gillette-Guyonnet, S, G Abellan Van Kan, S Andrieu, P Barberger-Gateau, C Berr, M Bonnefoy, J F Dartigues, et al. 2007. «IANA TASK FORCE ON NUTRITION AND COGNITIVE DECLINE WITH AGING». *The Journal of Nutrition* 11 (2): 22.
- Glavinas, Hristos, Péter Krajcsi, Judit Cserepes, e Balázs Sarkadi. 2004. «The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity». *Current Drug Delivery* 1 (1): 27–42. <https://doi.org/10.2174/1567201043480036>.
- González-Flecha, B., J. C. Cutrin, e A. Boveris. 1993. «Time Course and Mechanism of Oxidative Stress and Tissue Damage in Rat Liver Subjected to in Vivo Ischemia-Reperfusion». *The Journal of Clinical Investigation* 91 (2): 456–64. <https://doi.org/10.1172/JCI116223>.
- Graaf, Wilmar de, Stephanie Häusler, Michal Heger, Tessa M. van Ginhoven, Gert van Cappellen, Roelof J. Bennink, Gerd A. Kullak-Ublick, Rolf Hesselmann, Thomas M. van Gulik, e Bruno Stieger. 2011. «Transporters Involved in the Hepatic Uptake of 99mTc-Mebrofenin and Indocyanine Green». *Journal of Hepatology* 54 (4): 738–45. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.047>.
- Green, Richard M., Kathy Lo, Coreen Sterritt, e David R. Beier. 1999. «Cloning and Functional Expression of a Mouse Liver Organic Cation Transporter». *Hepatology* 29 (5): 1556–62. <https://doi.org/10.1002/hep.510290530>.
- Grojean, Stéphanie, Violette Koziel, Paul Vert, e Jean-Luc Daval. 2000. «Bilirubin Induces Apoptosis via Activation of NMDA Receptors in Developing Rat Brain Neurons». *Experimental Neurology* 166 (2): 334–41. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7518>.
- Gutierrez-Merino, C., C. Lopez-Sanchez, R. Lagoa, A. K. Samhan-Arias, C. Bueno, e V. Garcia-Martinez. 2011. «Neuroprotective Actions of Flavonoids». *Current Medicinal Chemistry* 18 (8): 1195–1212. <https://doi.org/10.2174/092986711795029735>.
- Hagenbuch, Bruno, e Bruno Stieger. 2013. «The SLCO (Former SLC21) Superfamily of Transporters». *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2–3): 396–412. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.009>.
- Halliwell, B. 1999. «Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the

- Beginning)». *Free Radical Research* 31 (4): 261–72.
<https://doi.org/10.1080/10715769900300841>.
- Halliwell, B. 2006. «Proteasomal Dysfunction: A Common Feature of Neurodegenerative Diseases? Implications for the Environmental Origins of Neurodegeneration». *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (11–12): 2007–19.
<https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.2007>.
- Halliwell, B., K. Zhao, e M. Whiteman. 2000. «The Gastrointestinal Tract: A Major Site of Antioxidant Action?» *Free Radical Research* 33 (6): 819–30.
<https://doi.org/10.1080/10715760000301341>.
- Ham, Tjakko J. van, Karen L. Thijssen, Rainer Breitling, Robert M. W. Hofstra, Ronald H. A. Plasterk, e Ellen A. A. Nollen. 2008. «C. Elegans Model Identifies Genetic Modifiers of α -Synuclein Inclusion Formation During Aging». A cura di Stuart K. Kim. *PLoS Genetics* 4 (3): e1000027. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000027>.
- Hansen, Thor W. R., Ronald J. Wong, e David K. Stevenson. 2020. «Molecular Physiology and Pathophysiology of Bilirubin Handling by the Blood, Liver, Intestine, and Brain in the Newborn». *Physiological Reviews* 100 (3): 1291–1346.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2019>.
- Hayashi, Kyoko, Munekazu Inuma, Kohei Sasaki, e Toshimitsu Hayashi. 2012. «In Vitro and in Vivo Evaluation of a Novel Antiherpetic Flavonoid, 4'-Phenylflavone, and Its Synergistic Actions with Acyclovir». *Archives of Virology* 157 (8): 1489–98.
<https://doi.org/10.1007/s00705-012-1335-6>.
- Higgins, Gavin C., Philip M. Beart, Yea Seul Shin, Minghui Jessica Chen, Nam Sang Cheung, e Phillip Nagley. 2010. «Oxidative Stress: Emerging Mitochondrial and Cellular Themes and Variations in Neuronal Injury». A cura di Xiongwei Zhu, M. Flint Beal, Xinglong Wang, George Perry, e Mark A. Smith. *Journal of Alzheimer's Disease* 20 (s2): S453–73. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100321>.
- Hinkelbein, Jochen, Robert Feldmann, e Armin Kalenka. 2010. «Time-dependent alterations of cerebral proteins following short-term normobaric hyperoxia». *Molecular and cellular biochemistry* 339 (giugno): 9–21. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0365-1>.
- Hollman, P. C., e M. B. Katan. 1999. «Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 37 (9–10): 937–42.
[https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00079-4).
- Hollman, P. C., J. H. de Vries, S. D. van Leeuwen, M. J. Mengelers, e M. B. Katan. 1995. «Absorption of Dietary Quercetin Glycosides and Quercetin in Healthy Ileostomy Volunteers». *The American Journal of Clinical Nutrition* 62 (6): 1276–82.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1276>.
- Horsfall, Laura J, Irwin Nazareth, Stephen P Pereira, e Irene Petersen. 2013. «Gilbert's Syndrome and the Risk of Death: A Population-Based Cohort Study.» *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28 (10): 1643–47.

<https://doi.org/10.1111/jgh.12279>.

- Hurk, Peter van den . 2006. «Bile fluorescence, heme oxygenase induction, and increased biliverdin excretion by mixtures of environmental toxicants». *Aquatic Toxicology* 77 (2): 202–9.
- Im, Sung-Eun, Tae-Gyu Nam, Hyungjae Lee, Min-Woo Han, Ho Jin Heo, Sung I. Koo, Chang Yong Lee, e Dae-Ok Kim. 2013. «Anthocyanins in the Ripe Fruits of *Rubus Coreanus* Miquel and Their Protective Effect on Neuronal PC-12 Cells». *Food Chemistry* 139 (1–4): 604–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.057>.
- Iusuf, Dilek, Evita van de Steeg, e Alfred H. Schinkel. 2012. «Functions of OATP1A and 1B Transporters in Vivo: Insights from Mouse Models». *Trends in Pharmacological Sciences* 33 (2): 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.10.005>.
- Iwatani, S., Nakamura, H., Kurokawa, D., Yamana, K., Nishida, K., Fukushima, S., Koda, T., Nishimura, N., Nishio, H., Iijima, K., Miyawaki, A., & Morioka, I. (2016). Fluorescent protein-based detection of unconjugated bilirubin in newborn serum. *Scientific Reports*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep28489>.
- Jacobsen, J. 1969. «Binding of Bilirubin to Human Serum Albumin - Determination of the Dissociation Constants». *FEBS Letters* 5 (2): 112–14. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(69\)80307-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(69)80307-8).
- Jayanti, Sri, Rita Moretti, Claudio Tiribelli, e Silvia Gazzin. 2020. «Bilirubin and Inflammation in Neurodegenerative and Other Neurological Diseases». *Neuroimmunology and Neuroinflammation* 2020 (maggio). <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2019.14>.
- Jung, Chang Hee, Min Jung Lee, Yu Mi Kang, Jenie Yoonoo Hwang, Jung Eun Jang, Jaechan Leem, Joong-Yeol Park, Hong-Kyu Kim, e Woo Je Lee. 2014. «Higher Serum Bilirubin Level as a Protective Factor for the Development of Diabetes in Healthy Korean Men: A 4year Retrospective Longitudinal Study». *Metabolism* 63 (1): 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.011>.
- Jung, K. Y., M. Takeda, D. K. Kim, A. Tojo, S. Narikawa, B. S. Yoo, M. Hosoyamada, S. H. Cha, T. Sekine, e H. Endou. 2001. «Characterization of Ochratoxin A Transport by Human Organic Anion Transporters». *Life Sciences* 69 (18): 2123–35. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)01296-6](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)01296-6).
- Kähkönen, Marja P., e Marina Heinonen. 2003. «Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (3): 628–33. <https://doi.org/10.1021/jf025551i>.
- Kalt, Wilhelmina, Jeffrey B. Blumberg, Jane E. McDonald, Melinda R. Vinqvist-Tymchuk, Sherry A. E. Fillmore, Brigitte A. Graf, Jennifer M. O’Leary, e Paul E. Milbury. 2008. «Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (3): 705–12. <https://doi.org/10.1021/jf071998l>.
- Kang, Tong, Jin Hur, Hyun Kim, Jong Ryu, e Sun Kim. 2006. «Neuroprotective effects of the

- cyanidin-3-O- β -D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia». *Neuroscience letters* 391 (febbraio): 122–26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.053>.
- Kantor, T. G. 1986. «Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties». *Pharmacotherapy* 6 (3): 93–103. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1986.tb03459.x>.
- Kapitulnik, J., e F. J. Gonzalez. 1993. «Marked Endogenous Activation of the CYP1A1 and CYP1A2 Genes in the Congenitally Jaundiced Gunn Rat». *Molecular Pharmacology* 43 (5): 722–25.
- Karawajczyk, Anna, Viktor Drgan, Nevenka Medic, Ganiyu Oboh, Sabina Passamonti, e Marjana Novič. 2007. «Properties of Flavonoids Influencing the Binding to Bilitranslocase Investigated by Neural Network Modelling». *Biochemical Pharmacology* 73 (2): 308–20. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.024>.
- Kato, Koji, Yoshitaka Hasegawa, Katsuya Iwata, Takuya Ichikawa, Tohru Yahara, Satoshi Tsuji, Masayuki Sugiura, e Jun-ichi Yamaguchi. 2016. «Recommendation to Exclude Bile-Duct-Cannulated Rats with Hyperbilirubinemia for Proper Conduct of Biliary Drug Excretion Studies». *Drug Metabolism and Disposition* 44 (8): 1180–83. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.070532>.
- Khamdang, Suparat, Michio Takeda, Minoru Shimoda, Rie Noshiro, Shinichi Narikawa, Xiu-Lin Huang, Atsushi Enomoto, Pawinee Piyachaturawat, e Hitoshi Endou. 2004. «Interactions of Human- and Rat-Organic Anion Transporters with Pravastatin and Cimetidine». *Journal of Pharmacological Sciences* 94 (2): 197–202. <https://doi.org/10.1254/jphs.94.197>.
- Kikuchi, Shojiro, Masaki Hata, Kanehisa Fukumoto, Yukari Yamane, Takeshi Matsui, Atsushi Tamura, Shigenobu Yonemura, et al. 2002. «Radixin Deficiency Causes Conjugated Hyperbilirubinemia with Loss of Mrp2 from Bile Canalicular Membranes». *Nature Genetics* 31 (3): 320–25. <https://doi.org/10.1038/ng905>.
- Kitson, Trevor M. 2004. «Spectrophotometric and Kinetic Studies on the Binding of the Bioflavonoid Quercetin to Bovine Serum Albumin». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68 (10): 2165–70. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2165>.
- Koepsell, Hermann, e Hitoshi Endou. 2004. «The SLC22 Drug Transporter Family». *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447 (5): 666–76. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1089-9>.
- Kong, Jin-Ming, Lian-Sai Chia, Ngoh-Khang Goh, Tet-Fatt Chia, e R. Brouillard. 2003. «Analysis and Biological Activities of Anthocyanins». *Phytochemistry* 64 (5): 923–33. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2).
- Kotsampasakou, Eleni, Sylvia E. Escher, e Gerhard F. Ecker. 2017. «Linking Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 and 1B3 (OATP1B1 and OATP1B3) Interaction Profiles to Hepatotoxicity - The Hyperbilirubinemia Use Case». *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 100 (marzo): 9–16.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.002>.

- Kowalczyk, Tomasz, Katarzyna Hnatuszko-Konka, Aneta Gerszberg, e Andrzej K. Kononowicz. 2014. «Elastin-like Polypeptides as a Promising Family of Genetically-Engineered Protein Based Polymers». *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 30 (8): 2141–52. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1649-5>.
- Kwon, J., Park, J. S., Kang, M., Choi, S., Park, J., Kim, G. T., Lee, C., Cha, S., Rhee, H. W., & Shim, S. H. (2020). Bright ligand-activatable fluorescent protein for high-quality multicolor live-cell super-resolution microscopy. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14067-4>.
- Krikorian, Robert, Erin L. Boespflug, David E. Fleck, Amanda L. Stein, JoLynne D. Wightman, Marcelle D. Shidler, e Sara Sadat-Hossieny. 2012. «Concord Grape Juice Supplementation and Neurocognitive Function in Human Aging». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (23): 5736–42. <https://doi.org/10.1021/jf300277g>.
- Krikorian, Robert, Marcelle D. Shidler, Tiffany A. Nash, Wilhelmina Kalt, Melinda R. Vinqvist-Tymchuk, Barbara Shukitt-Hale, e James A. Joseph. 2010. «Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults †». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7): 3996–4000. <https://doi.org/10.1021/jf9029332>.
- Krinsky, N. I. 1992. «Mechanism of Action of Biological Antioxidants». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 200 (2): 248–54. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>.
- Kumagai, Akiko, Ryoko Ando, Hideyuki Miyatake, Peter Greimel, Toshihide Kobayashi, Yoshio Hirabayashi, Tomomi Shimogori, e Atsushi Miyawaki. 2013. «A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle». *Cell* 153 (7): 1602–11.
- Kurin, Elena, Atanas Atanasov, Oliver Donath, Elke Heiss, Verena Dirsch, e Milan Nagy. 2012. «Synergy Study of the Inhibitory Potential of Red Wine Polyphenols on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation». *Planta medica* 78 (aprile): 772–78. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298440>.
- Kwon, Jiwoong, Jong Seok Park, Minsu Kang, Soobin Choi, Jumi Park, Gyeong Tae Kim, Changwook Lee, Sangwon Cha, Hyun Woo Rhee, e Sang Hee Shim. 2020. «Bright Ligand-Activatable Fluorescent Protein for High-Quality Multicolor Live-Cell Super-Resolution Microscopy». *Nature Communications* 11 (1): 273. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14067-4>.
- Langa, Kenneth M., Norman L. Foster, e Eric B. Larson. 2004. «Mixed Dementia: Emerging Concepts and Therapeutic Implications». *JAMA* 292 (23): 2901. <https://doi.org/10.1001/jama.292.23.2901>.
- Levitt, David G, e Michael D Levitt. 2014. «Quantitative Assessment of the Multiple Processes Responsible for Bilirubin Homeostasis in Health and Disease.» *Clinical and Experimental Gastroenterology* 7 (gennaio): 307–28. <https://doi.org/10.2147/CEG.S64283>.

- Lightner, David A., Darren L. Holmes, e Antony F. McDonagh. 1996. «On the Acid Dissociation Constants of Bilirubin and Biliverdin». *Journal of Biological Chemistry* 271 (5): 2397–2405. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2397>.
- Lima, Cristovao F., Manuel Fernandes-Ferreira, e Cristina Pereira-Wilson. 2006. «Phenolic Compounds Protect HepG2 Cells from Oxidative Damage: Relevance of Glutathione Levels». *Life Sciences* 79 (21): 2056–68. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.042>.
- Lindenblatt, N., R. Bordel, W. Schareck, M.D. Menger, e B. Vollmar. 2004. «Vascular Heme Oxygenase-1 Induction Suppresses Microvascular Thrombus Formation In Vivo». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (3): 601–6. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000118279.74056.8a>.
- Loprinzi, Paul D, e Sara E Mahoney. 2015. «Association between Flavonoid-Rich Fruit and Vegetable Consumption and Total Serum Bilirubin.» *Angiology* 66 (3): 286–90. <https://doi.org/10.1177/0003319714537111>.
- Luchsinger, José A, e Richard Mayeux. 2004. «Dietary Factors and Alzheimer's Disease». *The Lancet Neurology* 3 (10): 579–87. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00878-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00878-6).
- Macchi, G., C. Brahe, e M. Pomponi. 1997. «Alois Alzheimer and Gaetano Perusini: Should Man Divide What Fate United?» *Behavioural Neurology* 10 (4): 105–8. <https://doi.org/10.3233/BEN-1997-10401>.
- Maestro, Alessandra, Michela Terdoslavich, Andreja Vanzo, Adenike Kuku, Federica Tramer, Vanessa Nicolin, Fulvio Micali, Giuliana Decorti, e Sabina Passamonti. 2010. «Expression of Bilitranslocase in the Vascular Endothelium and Its Function as a Flavonoid Transporter». *Cardiovascular Research* 85 (1): 175–83. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp290>.
- Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, e Liliana Jiménez. 2004. «Polyphenols: Food Sources and Bioavailability». *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (5): 727–47. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- Manach, Claudine, Gary Williamson, Christine Morand, Augustin Scalbert, e Christian Rémésy. 2005. «Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies». *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (1): 230S–242S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>.
- Mancuso, Cesare. 2017. «Bilirubin and Brain: A Pharmacological Approach». *Neuropharmacology* 118 (maggio): 113–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.013>.
- Mancuso, Cesare, Alessia Bonsignore, Enrico Di Stasio, Alvaro Mordente, e Roberto Motterlini. 2003. «Bilirubin and S-Nitrosothiols Interaction: Evidence for a Possible Role of Bilirubin as a Scavenger of Nitric Oxide». *Biochemical Pharmacology* 66 (12): 2355–63. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.08.022>.
- Mao, Peizhong. 2013. «Oxidative Stress and Its Clinical Applications in Dementia». *Journal of Neurodegenerative Diseases* 2013 (agosto): 1–15.

<https://doi.org/10.1155/2013/319898>.

- Martelanc, Mitja, Lovro Žiberna, Sabina Passamonti, e Mladen Franko. 2014. «Direct determination of free bilirubin in serum at sub-nanomolar levels». *Analytica Chimica Acta* 809: 174–82.
- Martelanc, Mitja, Lovro Žiberna, Sabina Passamonti, e Mladen Franko. 2016. «Application of high-performance liquid chromatography combined with ultra-sensitive thermal lens spectrometric detection for simultaneous biliverdin and bilirubin assessment at trace levels in human serum». *Talanta* 154 (luglio): 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.053>.
- Maruhashi, Tatsuya, Junko Soga, Noritaka Fujimura, Naomi Idei, Shinsuke Mikami, Yumiko Iwamoto, Masato Kajikawa, et al. 2012. «Hyperbilirubinemia, Augmentation of Endothelial Function, and Decrease in Oxidative Stress in Gilbert Syndrome». *Circulation* 126 (5): 598 LP – 603.
- Mastaloudis, Angela, e Steven M. Wood. 2012. «Age-Related Changes in Cellular Protection, Purification, and Inflammation-Related Gene Expression: Role of Dietary Phytonutrients: Phytonutrients and Age-Related Gene Expression». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1259 (1): 112–20. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06610.x>.
- Mattioli, Roberto, Antonio Francioso, Luciana Mosca, e Paula Silva. 2020. «Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases». *Molecules* 25 (17): 3809. <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>.
- Mazza, G. 1995. «Anthocyanins in Grapes and Grape Products». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35 (4): 341–71. <https://doi.org/10.1080/10408399509527704>.
- Mazza, G., e E. Miniati. 1993. «Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains.» *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930320836?freeview=true>.
- Mazza, G., e E. Miniati, a c. di. 2017. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351069700>.
- McCarty, Mark F. 2007. «' "Iatrogenic Gilbert Syndrome" "--a Strategy for Reducing Vascular and Cancer Risk by Increasing Plasma Unconjugated Bilirubin.» *Medical Hypotheses* 69 (5): 974–94. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.12.069>.
- McDonagh, A F. 1997. «Binding of [3H]bilirubin to albumin and plasma membrane vesicles.» *Biochemical Journal* 321 (Pt 1): 262–64.
- Meier, P J, U Eckhardt, A Schroeder, B Hagenbuch, e B Stieger. 1997. «Substrate Specificity of Sinusoidal Bile Acid and Organic Anion Uptake Systems in Rat and Human Liver». *Hepatology* 26 (6): 1667–77. <https://doi.org/10.1002/hep.510260641>.
- Meier, Peter J., e B. Stieger. 2002. «Bile Salt Transporters». *Annual Review of Physiology* 64:

- 635–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.082201.100300>.
- Meyer Zu Schwabedissen, Henriette E, Joseph A Ware, Rommel G Tirona, e Richard B Kim. 2009. «Identification, Expression, and Functional Characterization of Full-Length and Splice Variants of Murine Organic Anion Transporting Polypeptide 1b2.» *Molecular Pharmaceutics* 6 (6): 1790–97. <https://doi.org/10.1021/mp900030w>.
- Mhatre, Molina, Robert A. Floyd, e Kenneth Hensley. 2004. «Oxidative Stress and Neuroinflammation in Alzheimer’s Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Common Links and Potential Therapeutic Targets». *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 6 (2): 147–57. <https://doi.org/10.3233/jad-2004-6206>.
- Milbury, Paul E., e Wilhelmina Kalt. 2010. «Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood–Brain Barrier †». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7): 3950–56. <https://doi.org/10.1021/jf903529m>.
- Monte, Suzanne M. de la, e Ming Tong. 2014. «Brain Metabolic Dysfunction at the Core of Alzheimer’s Disease». *Biochemical Pharmacology* 88 (4): 548–59. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.012>.
- Moreira, Paula I., Cristina Carvalho, Xiongwei Zhu, Mark A. Smith, e George Perry. 2010. «Mitochondrial Dysfunction Is a Trigger of Alzheimer’s Disease Pathophysiology». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (1): 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.006>.
- Morita, N., H. Kusuvara, T. Sekine, H. Endou, e Y. Sugiyama. 2001. «Functional Characterization of Rat Organic Anion Transporter 2 in LLC-PK1 Cells». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298 (3): 1179–84.
- Morita, Naomi, Hiroyuki Kusuvara, Yoshitane Nozaki, Hitoshi Endou, e Yuichi Sugiyama. 2005. «FUNCTIONAL INVOLVEMENT OF RAT ORGANIC ANION TRANSPORTER 2 (SLC22A7) IN THE HEPATIC UPTAKE OF THE NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG KETOPROFEN». *Drug Metabolism and Disposition* 33 (8): 1151–57. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001552>.
- Moynihan, W A. 1966. «Rabies in Ontario». *Canadian Journal of Public Health = Revue Canadienne de Sante Publique* 57 (6): 243–48.
- Muller, M., e P. L. Jansen. 1997. «Molecular Aspects of Hepatobiliary Transport». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 272 (6): G1285–1303. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.6.G1285>.
- Muraca, M., J. Fevery, e N. Blanckaert. 1987. «Relationships between Serum Bilirubins and Production and Conjugation of Bilirubin. Studies in Gilbert’s Syndrome, Crigler-Najjar Disease, Hemolytic Disorders, and Rat Models». *Gastroenterology* 92 (2): 309–17. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90123-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90123-5).
- Ngashangva, L., Bachu, V., & Goswami, P. (2019). Development of new methods for determination of bilirubin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 272–285. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.034>.

- Nagley, Phillip, Gavin C. Higgins, Julie D. Atkin, e Philip M. Beart. 2010. «Multifaceted Deaths Orchestrated by Mitochondria in Neurones». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (1): 167–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.004>.
- Newhouse, Kenneth E. 1986. «Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 59 (1): 71–72.
- Nicholson, Sonja K., Gregory A. Tucker, e John M. Brameld. 2008. «Effects of Dietary Polyphenols on Gene Expression in Human Vascular Endothelial Cells». *Proceedings of the Nutrition Society* 67 (1): 42–47. <https://doi.org/10.1017/S0029665108006009>.
- Nijveldt, Robert J, Els van Nood, Danny EC van Hoorn, Petra G Boelens, Klaske van Norren, e Paul AM van Leeuwen. 2001. «Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications». *The American Journal of Clinical Nutrition* 74 (4): 418–25. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>.
- Nimse, Satish Balasaheb, e Dilipkumar Pal. 2015. «Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms». *RSC Advances* 5 (35): 27986–6. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>.
- Olanow, C., H. Klawans, W. Koller, e J. Langston. 1990. «Oxidation Reactions in Parkinson's Disease. Discussion». *Undefined*. /paper/Oxidation-reactions-in-Parkinson%27s-disease.-Olanow-Klawans/0c401bfd3cd51812b1bd0191eb16d9c19dbbb2d2.
- Ovrevik, Johan, Magne Refsnes, Marit Låg, Jørn Holme, e Per Schwarze. 2015. «Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant-and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms». *Biomolecules* 2015 (luglio): 1399–1440. <https://doi.org/10.3390/biom5031399>.
- Pappolla, M A, R A Omar, e N K Robakis. s.d. «Immunohistochemical Evidence of Antioxidant Stress in Alzheimer's Disease», 8.
- Passamonti, S, L Battiston, e G L Sottocasa. 1998. «Bilitranslocase Can Exist in Two Metastable Forms with Different Affinities for the Substrates--Evidence from Cysteine and Arginine Modification.» *European Journal of Biochemistry / FEBS* 253 (1): 84–90.
- Passamonti, S., a. Vanzo, U. Vrhovsek, M. Terdoslavich, a. Cocolo, G. Decorti, e F. Mattivi. 2005. «Hepatic uptake of grape anthocyanins and the role of bilitranslocase». *Food Research International* 38 (8–9): 953–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.015>.
- Passamonti, S, U Vrhovsek, e F Mattivi. 2002. «The interaction of anthocyanins with bilitranslocase». *Biochem Biophys Res Commun* 296 (3): 631–36. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00927-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00927-0).
- Passamonti, Sabina, Lucia Battiston, e Gian Luigi Sottocasa. 1997. «Arylsulfonylation of bilitranslocase in plasma membranes from rat liver enables to discriminate between natural and artificial substrates». *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1323

(1): 130–36.

- Passamonti, Sabina, Lucia Battiston, e Gian Luigi Sottocasa. 2000. «Gastric Uptake of Nicotinic Acid by Bilitranslocase». *FEBS Letters* 482 (1–2): 167–68. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02041-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02041-X).
- Passamonti, Sabina, Alessandra Cocolo, Enrico Braidot, Elisa Petrusa, Carlo Peresson, Nevenka Medic, Francesco Macri, e Angelo Vianello. 2005. «Characterization of Electrogenic Bromosulphophthalein Transport in Carnation Petal Microsomes and Its Inhibition by Antibodies against Bilitranslocase». *The FEBS Journal* 272 (13): 3282–96. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04751.x>.
- Passamonti, Sabina, Michela Terdoslavich, Alja Margon, Alessandra Cocolo, Nevenka Medic, Fulvio Micali, Giuliana Decorti, e Mladen Franko. 2005. «Uptake of bilirubin into HepG2 cells assayed by thermal lens spectroscopy: Function of bilitranslocase». *FEBS Journal* 272 (21): 5522–35.
- Passamonti, Sabina, Urska Vrhovsek, e Fulvio Mattivi. 2002. «The Interaction of Anthocyanins with Bilitranslocase». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296 (3): 631–36. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00927-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00927-0).
- Passamonti, Sabina, Urska Vrhovsek, Andreja Vanzo, e Fulvio Mattivi. 2003. «The Stomach as a Site for Anthocyanins Absorption from Food». *FEBS Letters* 544 (1–3): 210–13. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00504-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00504-0).
- «Pathological Correlates of Late-Onset Dementia in a Multicentre, Community-Based Population in England and Wales». 2001. *The Lancet* 357 (9251): 169–75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03589-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03589-3).
- Pearce, R. K. B., A. Owen, S. Daniel, P. Jenner, e C. D. Marsden. 1997. «Alterations in the Distribution of Glutathione in the Substantia Nigra in Parkinson's Disease». *Journal of Neural Transmission* 104 (6–7): 661–77. <https://doi.org/10.1007/BF01291884>.
- Perdih, Andrej, Amrita Roy Choudhury, Špela Župerl, Emilia Sikorska, Igor Zhukov, Tom Solmajer, e Marjana Novič. 2012. «Structural Analysis of a Peptide Fragment of Transmembrane Transporter Protein Bilitranslocase». *PloS One* 7 (6): e38967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038967>.
- Persico, M. 2001. «Hepatic Uptake of Organic Anions Affects the Plasma Bilirubin Level in Subjects with Gilbert's Syndrome Mutations in UGT1A1». *Hepatology* 33 (3): 627–32. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22499>.
- Person, Richard V., Blake R. Peterson, e David A. Lightner. 1994. «Bilirubin Conformational Analysis and Circular Dichroism». *Journal of the American Chemical Society* 116 (1): 42–59. <https://doi.org/10.1021/ja00080a006>.
- Petersen, C. E., C. E. Ha, K. Harohalli, J. B. Feix, e N. V. Bhagavan. 2000. «A Dynamic Model for Bilirubin Binding to Human Serum Albumin». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (28): 20985–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001038200>.

- «Pharmacology and Therapeutics: Principles to... [PDF]». s.d. PDF Room. Consultato 22 giugno 2021. <https://pdfroom.com/books/pharmacology-and-therapeutics-principles-to-practice-expert-consult-online-and-print-1e/v0K2lmaw5ap>.
- Prince, Martin, Emiliano Albanese, Maëlen Guerchet, e Matthew Prina. 2014. *World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction. An Analysis of Protective and Modifiable Factors*.
- Providência, Rui. s.d. «Protecção Cardiovascular Por Bebidas Alcoólicas: Bases Científicas Do Paradoxo Francês [79]». *Rev Port Cardiol* 25: 17.
- Qin, Xiao-ling, Qing-shan Zhang, Li Sun, Meng-wei Hao, e Zhao-ting Hu. 2015. «Lower Serum Bilirubin and Uric Acid Concentrations in Patients with Parkinson's Disease in China». *Cell Biochemistry and Biophysics* 72 (1): 49–56. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0402-x>.
- Rainsford, K. D., P. I. Stetsko, S. P. Sirko, e S. Debski. 2003. «Gastrointestinal Mucosal Injury Following Repeated Daily Oral Administration of Conventional Formulations of Indometacin and Other Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs to Pigs: A Model for Human Gastrointestinal Disease». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55 (5): 661–68. <https://doi.org/10.1211/002235703765344577>.
- Rasool, Ahsan, Sabir Sabir, Muhammad Ashlaq, Umer Farooq, Muhammad Zatmar Khan, e Faisal Yousaf Khan. 2015. «GILBERT'S SYNDROME - A CONCEALED ADVERSITY FOR PHYSICIANS AND SURGEONS.» *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC* 27 (3): 707–10.
- Rawal, R., Kharangarh, P. R., Dawra, S., Tomar, M., Gupta, V., & Pundir, C. S. (2020). A comprehensive review of bilirubin determination methods with special emphasis on biosensors. *Process Biochemistry*, 89(November 2019), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.034>.
- Riha, Juliane, Stefan Brenner, Alzbeta Srovnalova, Lukas Klameth, Zdenek Dvorak, Walter Jäger, e Theresia Thalhammer. 2015. «Effects of Anthocyanins on the Expression of Organic Anion Transporting Polypeptides (SLCOs/OATPs) in Primary Human Hepatocytes». *Food & Function* 6 (3): 772–79. <https://doi.org/10.1039/c4fo00977k>.
- Rijk, M. D. de, M. Breteler, J. den Breeijen, L. Launer, D. Grobbee, F. V. D. van der Meché, e A. Hofman. 1997. «Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study.» *Archives of neurology*. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.1997.00550180070015>.
- Robak, Jadwiga, e Ryszard J. Gryglewski. 1988. «Flavonoids Are Scavengers of Superoxide Anions». *Biochemical Pharmacology* 37 (5): 837–41. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90169-4).
- Rodrigues, Cecilia M. P., Susana Solá, e Dora Brites. 2002. «Bilirubin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway in Developing Rat Brain Neurons: Bilirubin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway in Developing Rat Brain Neurons». *Hepatology* 35 (5): 1186–95. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.32967>.

- Ross, Robert A., Barbara A. Spengler, e June L. Biedler. 1983. «Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells2». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 71 (4): 741–47. <https://doi.org/10.1093/jnci/71.4.741>.
- Rothermich, N. O. 1966. «An Extended Study of Indomethacin. II. Clinical Therapy». *JAMA* 195 (13): 1102–6.
- Roy Choudhury, Amrita, Andrej Perdih, Spela Zuperl, Emilia Sikorska, Tom Solmajer, Stefan Jurga, Igor Zhukov, e Marjana Novic. 2013. «Structural Elucidation of Transmembrane Transporter Protein Bilitranslocase: Conformational Analysis of the Second Transmembrane Region TM2 by Molecular Dynamics and NMR Spectroscopy.» *Biochimica et Biophysica Acta* 1828 (11): 2609–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.006>.
- Roy Choudhury, Amrita, Emilia Sikorska, Johannes van den Boom, Peter Bayer, Lukasz Popenda, Kosma Szutkowski, Stefan Jurga, et al. 2015. «Structural Model of the Bilitranslocase Transmembrane Domain Supported by NMR and FRET Data.» *PloS One* 10 (8): e0135455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135455>.
- Rusishvili, Mariami, Luca Grisanti, Sara Laporte, Marco Micciarelli, Marta Rosa, Rebecca J. Robbins, Tom Collins, Alessandra Magistrato, e Stefano Baroni. 2019. «Unraveling the Molecular Mechanisms of Color Expression in Anthocyanins». *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 21 (17): 8757–66. <https://doi.org/10.1039/c9cp00747d>.
- Saier, Milton H. 2000. «A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (2): 354–411. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.2.354-411.2000>.
- Savva, George M, Gillian Forster, e Fiona E Matthews. 2009. «Age, Neuropathology, and Dementia». *N Engl J Med*, 8.
- Scalbert, A., e G. Williamson. 2000. «Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols». *The Journal of Nutrition* 130 (8S Suppl): 2073S–85S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>.
- Scalbert, Augustin, Claudine Manach, Christine Morand, Christian Rémésy, e Liliana Jiménez. 2005. «Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (4): 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>.
- Scharschmidt, B F, J G Waggoner, e P D Berk. 1975. «Hepatic Organic Anion Uptake in the Rat.» *The Journal of Clinical Investigation* 56 (5): 1280–92. <https://doi.org/10.1172/JCI108204>.
- Scherzinger, Eberhard, Rudi Lurz, Mark Turmaine, Laura Mangiarini, Birgit Hollenbach, Renate Hasenbank, Gillian P Bates, Stephen W Davies, Hans Lehrach, e Erich E Wanker. 1997. «Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo». *Cell* 90 (3): 549–58. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80514-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80514-0).
- Schipper, Hyman M, Wei Song, Ayda Tavitian, e Marisa Cressatti. 2019. «The Sinister Face

- of Heme Oxygenase-1 in Brain Aging and Disease». *Progress in Neurobiology* 172 (gennaio): 40–70. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.06.008>.
- Schipperus, Roelof, Rosalie L. M. Teeuwen, Marc W. T. Werten, Gerrit Eggink, e Frits A. de Wolf. 2009. «Secreted Production of an Elastin-like Polypeptide by *Pichia Pastoris*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2082-9>.
- Schneider, Julie A., Zoe Arvanitakis, Woojeong Bang, e David A. Bennett. 2007. «Mixed Brain Pathologies Account for Most Dementia Cases in Community-Dwelling Older Persons». *Neurology* 69 (24): 2197–2204. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000271090.28148.24>.
- Shah, Shahid ali, Ikram Ullah, Hae Young Lee, e Myeong Ok Kim. 2013. «Anthocyanins Protect Against Ethanol-Induced Neuronal Apoptosis via GABAB1 Receptors Intracellular Signaling in Prenatal Rat Hippocampal Neurons». *Molecular Neurobiology* 48 (1): 257–69. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8458-y>.
- Shih, Ping-Hsiao, Yin-Ching Chan, Jiunn-Wang Liao, Ming-Fu Wang, e Gow-Chin Yen. 2010. «Antioxidant and Cognitive Promotion Effects of Anthocyanin-Rich Mulberry (*Morus Atropurpurea* L.) on Senescence-Accelerated Mice and Prevention of Alzheimer's Disease». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (7): 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.03.008>.
- Shim, Hoon, e Z. Leah Harris. 2003. «Genetic Defects in Copper Metabolism». *The Journal of Nutrition* 133 (5): 1527S-1531S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1527S>.
- Shin, Eun-Joo, Ji Hoon Jeong, Yoon Hee Chung, Won-Ki Kim, Kwang-Ho Ko, Jae-Hyung Bach, Jau-Shyong Hong, Yukio Yoneda, e Hyoung-Chun Kim. 2011. «Role of Oxidative Stress in Epileptic Seizures». *Neurochemistry International* 59 (2): 122–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.03.025>.
- Shitara, Yoshihisa, Hitoshi Sato, e Yuichi Sugiyama. 2005. «Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (1): 689–723. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121444>.
- Shitashima, Y., Shimozawa, T., Kumagai, A., Miyawaki, A., & Asahi, T. (2017). Two Distinct Fluorescence States of the Ligand-Induced Green Fluorescent Protein UnaG. *Biophysical Journal*, 113(12), 2805–2814. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.10.022>
- Shobab, Leila A, Ging-Yuek R Hsiung, e Howard H Feldman. 2005. «Cholesterol in Alzheimer's Disease». *The Lancet Neurology* 4 (12): 841–52. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70248-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70248-9).
- Shupeck, M., A. W. Wolkoff, B. F. Scharschmidt, J. G. Waggoner, e P. D. Berk. 1978. «Studies of the Kinetics of Purified Conjugated Bilirubin-3H in the Rat». *The American Journal of Gastroenterology* 70 (3): 259–64.
- Silva, Rui, Lucinda R. Mata, Sérgio Gulbenkian, Maria A. Brito, Claudio Tiribelli, e Dora

- Brites. 1999. «Inhibition of Glutamate Uptake by Unconjugated Bilirubin in Cultured Cortical Rat Astrocytes: Role of Concentration and PH». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265 (1): 67–72. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1646>.
- Silvestrini, M., Mardegan, A., Kamath, R., Madou, M., Moretto, L. M., Passamonti, S., Scopece, P., & Ugo, P. (2014). Pyrolyzed photoresist carbon electrodes in aprotic solvent: Bilirubin electrochemistry and interaction with electrogenerated superoxide. *Electrochimica Acta*, 147, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.09.046>.
- Sims, Neil R., e Hakan Muyderman. 2010. «Mitochondria, Oxidative Metabolism and Cell Death in Stroke». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (1): 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.003>.
- Singleton, C. K., e P. R. Martin. 2001. «Molecular Mechanisms of Thiamine Utilization». *Current Molecular Medicine* 1 (2): 197–207. <https://doi.org/10.2174/1566524013363870>.
- Skowrońska, Marta, e Jan Albrecht. 2013. «Oxidative and Nitrosative Stress in Ammonia Neurotoxicity». *Neurochemistry International* 62 (5): 731–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.10.013>.
- Son, Tae Gen, Simonetta Camandola, e Mark P. Mattson. 2008. «Hormetic Dietary Phytochemicals». *NeuroMolecular Medicine* 10 (4): 236–46. <https://doi.org/10.1007/s12017-008-8037-y>.
- Sottocasa, G. L., G. Baldini, G. Sandri, G. Lunazzi, e C. Tiribelli. 1982. «Reconstitution in Vitro of Sulfobromophthalein Transport by Bilitranslocase». *Biochimica Et Biophysica Acta* 685 (2): 123–28. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90088-8).
- Sottocasa, G. L., G. C. Lunazzi, e C. Tiribelli. 1989. «Isolation of Bilitranslocase, the Anion Transporter from Liver Plasma Membrane for Bilirubin and Other Organic Anions». *Methods in Enzymology* 174: 50–57. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)74009-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)74009-x).
- Sottocasa, G. L., S. Passamonti, L. Battiston, L. Pascolo, e C. Tiribelli. 1996. «Molecular Aspects of Organic Anion Uptake in Liver». *Journal of Hepatology* 24 Suppl 1: 36–41.
- Spencer, Jeremy P. E. 2009. «Flavonoids and Brain Health: Multiple Effects Underpinned by Common Mechanisms». *Genes & Nutrition* 4 (4): 243–50. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0136-3>.
- Standridge, John B. 2004. «Pharmacotherapeutic Approaches to the Prevention of Alzheimer's Disease». *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy* 2 (2): 119–32. [https://doi.org/10.1016/S1543-5946\(04\)90017-7](https://doi.org/10.1016/S1543-5946(04)90017-7).
- Steeg, Evita van de, Viktor Stránecký, Hana Hartmannová, Lenka Nosková, Martin Hřebíček, Els Wagenaar, Anita van Esch, Dirk R. de Waart, Ronald P.J. Oude Elferink, et al. 2012. «Complete OATP1B1 and OATP1B3 Deficiency Causes Human Rotor Syndrome by Interrupting Conjugated Bilirubin Reuptake into the Liver». *Journal of Clinical Investigation* 122 (2): 519–28. <https://doi.org/10.1172/JCI59526>.

- Steeg, Evita van de, Els Wagenaar, Cornelia M. M. van der Kruijssen, Johanna E. C. Burggraaff, Dirk R. de Waart, Ronald P. J. Oude Elferink, Kathryn E. Kenworthy, e Alfred H. Schinkel. 2010. «Organic Anion Transporting Polypeptide 1a/1b–Knockout Mice Provide Insights into Hepatic Handling of Bilirubin, Bile Acids, and Drugs». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (8): 2942–52. <https://doi.org/10.1172/JCI42168>.
- Sticova, Eva. 2013. «New Insights in Bilirubin Metabolism and Their Clinical Implications». *World Journal of Gastroenterology* 19 (38): 6398. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i38.6398>.
- Stieger, Bruno, Zainab M Mahdi, e Walter Jager. 2017. «Intestinal and Hepatocellular Transporters: Therapeutic Effects and Drug Interactions of Herbal Supplements». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 57 (gennaio): 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-105010>.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, e B. N. Ames. 1987. «Bilirubin Is an Antioxidant of Possible Physiological Importance». *Science (New York, N.Y.)* 235 (4792): 1043–46. <https://doi.org/10.1126/science.3029864>.
- Stollman, Y. R., U. Gärtner, L. Theilmann, N. Ohmi, e A. W. Wolkoff. 1983. «Hepatic Bilirubin Uptake in the Isolated Perfused Rat Liver Is Not Facilitated by Albumin Binding». *The Journal of Clinical Investigation* 72 (2): 718–23. <https://doi.org/10.1172/JCI111021>.
- Sugano, Tsukasa, Kohei SUDA, Masakazu SHIMADA, e Nozomu OSHINO. 1978. «Biochemical and ultrastructural evaluation of isolated rat liver systems perfused with a hemoglobin-free medium». *The Journal of Biochemistry* 83 (4): 995–1007.
- Tabner, B.J., S. Turnbull, O.M.A. El-Agnaf, e D. Allsop. 2001. «Production of Reactive Oxygen Species from Aggregating Proteins Implicated in Alzheimer’s Disease, Parkinson’s Disease and Other Neurodegenerative Diseases». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1 (6): 507–17. <https://doi.org/10.2174/1568026013394822>.
- Taillé, Camille, Abdelhamid Almolki, Moussa Benhamed, Christine Zedda, Jérôme Mégret, Patrick Berger, Guy Lesèche, et al. 2003. «Heme Oxygenase Inhibits Human Airway Smooth Muscle Proliferation via a Bilirubin-Dependent Modulation of ERK1/2 Phosphorylation». *Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 27160–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300364200>.
- Tarozzi, Andrea, Fabiana Morroni, Silvana Hrelia, Cristina Angeloni, Alessandra Marchesi, Giorgio Cantelli-Forti, e Patrizia Hrelia. 2007. «Neuroprotective Effects of Anthocyanins and Their in Vivo Metabolites in SH-SY5Y Cells». *Neuroscience Letters* 424 (1): 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.07.017>.
- Tarozzi, Andrea, Fabiana Morroni, Adriana Merlicco, Cecilia Bolondi, Gabriella Teti, Mirella Falconi, Giorgio Cantelli-Forti, e Patrizia Hrelia. 2010. «Neuroprotective Effects of Cyanidin 3-O-Glucopyranoside on Amyloid Beta (25–35) Oligomer-Induced Toxicity». *Neuroscience Letters* 473 (2): 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.02.006>.

- Teng, Zhaojun, Xinwei Jiang, Fatao He, e Weibin Bai. 2020. «Qualitative and Quantitative Methods to Evaluate Anthocyanins». *EFood* 1 (5): 339–46. <https://doi.org/10.2991/efood.k.200909.001>.
- Terao, Junji, Kaeko Murota, e Yoshichika Kawai. 2011. «Conjugated Quercetin Glucuronides as Bioactive Metabolites and Precursors of Aglyconein Vivo». *Food & Function* 2 (1): 11–17. <https://doi.org/10.1039/C0FO00106F>.
- Terdoslavich, Michela, Inge de Graaf, Johannes Proost, Alessandra Cocolo, Sabina Passamonti, e Geny Groothuis. 2013. «Bilitranslocase is Involved in the Uptake of Bromosulfophthalein in Rat and Human Liver». *Drug Metabolism Letters* 6 (marzo). <https://doi.org/10.2174/1872312811206030003>.
- Tewari, Devesh, Andrei Mocan, Emil Parvanov, Archana Sah, Seyed Nabavi, Lukasz Huminiecki, Zheng Feei Ma, Yeong Yeh Lee, Jarosław Horbańczuk, e Atanas Atanasov. 2017. «Ethnopharmacological Approaches for Therapy of Jaundice: Part I». *Frontiers in Pharmacology* 8 (agosto): 518. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00518>.
- Thackaberry, Evan A., Xiaojing Wang, Michelle Schweiger, Kirsten Messick, Nicole Valle, Brian Dean, Amy Sambrone, Terri Bowman, e Minli Xie. 2014. «Solvent-Based Formulations for Intravenous Mouse Pharmacokinetic Studies: Tolerability and Recommended Solvent Dose Limits». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 44 (3): 235–41. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845706>.
- Tokui, Taro, Daisuke Nakai, Rie Nakagomi, Hiromu Yawo, Takaaki Abe, e Yuichi Sugiyama. 1999. «Pravastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Is Transported by Rat Organic Anion Transporting Polypeptide, Oatp2». *Pharmaceutical Research* 16 (6): 904–8. <https://doi.org/10.1023/A:1018838405987>.
- Tsuda, Takanori, Fumihiko Horio, Junzoh Kitoh, e Toshihiko Osawa. s.d. «Protective Effects of Dietary Cyanidin 3-O- β -D-Glucoside on Liver Ischemia–Reperfusion Injury in Rats», 6.
- Ubhi, Kiren, Kevin Peng, Stephanie Lessig, Jennilyn Estrella, Anthony Adame, Douglas Galasko, David P. Salmon, Lawrence A. Hansen, Claudia H. Kawas, e Eliezer Masliah. 2010. «Neuropathology of Dementia with Lewy Bodies in Advanced Age: A Comparison with Alzheimer Disease». *Neuroscience Letters* 485 (3): 222–27. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.016>.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, e Joshua Telser. 2007. «Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- Vanzo, Andreja, Michela Terdoslavich, Anabel Brandoni, Adriana M. Torres, Urska Vrhovsek, e Sabina Passamonti. 2008. «Uptake of Grape Anthocyanins into the Rat Kidney and the Involvement of Bilitranslocase». *Molecular Nutrition & Food Research* 52 (10): 1106–16. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700505>.
- Vanzo, Andreja, Urska Vrhovsek, Federica Tramer, Fulvio Mattivi, e Sabina Passamonti. 2011.

- «Exceptionally Fast Uptake and Metabolism of Cyanidin 3-Glucoside by Rat Kidneys and Liver». *Journal of Natural Products* 74 (5): 1049–54. <https://doi.org/10.1021/np100948a>.
- Vargas, Ashley J, e Randy Burd. 2010. «Hormesis and Synergy: Pathways and Mechanisms of Quercetin in Cancer Prevention and Management: Nutrition Reviews©, Vol. 68, No. 7». *Nutrition Reviews* 68 (7): 418–28. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x>.
- Veer, P. van't, M. C. Jansen, M. Klerk, e F. J. Kok. 2000. «Fruits and Vegetables in the Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease». *Public Health Nutrition* 3 (1): 103–7. <https://doi.org/10.1017/s1368980000000136>.
- Venko, Katja, A Roy Choudhury, e Marjana Novic. 2017. «Computational Approaches for Revealing the Structure of Membrane Transporters: Case Study on Bilitranslocase.» *Computational and Structural Biotechnology Journal* 15: 232–42. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.008>.
- Vitek, Libor, e J. Ostrow. 2009. «Bilirubin Chemistry and Metabolism; Harmful and Protective Aspects». *Current Pharmaceutical Design* 15 (25): 2869–83. <https://doi.org/10.2174/138161209789058237>.
- Vrhovski, Bernadette, e Anthony S. Weiss. 1998. «Biochemistry of Tropoelastin». *European Journal of Biochemistry* 258 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580001.x>.
- Wagner, Karl-Heinz, Ryan G. Shiels, Claudia Anna Lang, Nazlisadat Seyed Khoei, e Andrew C. Bulmer. 2018. «Diagnostic Criteria and Contributors to Gilbert's Syndrome». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 55 (2): 129–39. <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1428526>.
- Wang, Shiguo, Na Li, Wei Pan, e Bo Tang. 2012. «Advances in Functional Fluorescent and Luminescent Probes for Imaging Intracellular Small-Molecule Reactive Species». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 39 (ottobre): 3–37. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.010>.
- Wang, Xiaodong, Allan W. Wolkoff, e Marilyn E. Morris. 2005. «FLAVONOIDS AS A NOVEL CLASS OF HUMAN ORGANIC ANION-TRANSPORTING POLYPEPTIDE OATP1B1 (OATP-C) MODULATORS». *Drug Metabolism and Disposition* 33 (11): 1666–72. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005926>.
- Waterhouse, Andrew L. 2002. «Wine Phenolics». *Annals of the New York Academy of Sciences* 957 (maggio): 21–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>.
- Williams, Robert J., e Jeremy P.E. Spencer. 2012. «Flavonoids, Cognition, and Dementia: Actions, Mechanisms, and Potential Therapeutic Utility for Alzheimer Disease». *Free Radical Biology and Medicine* 52 (1): 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.010>.
- Wolkoff, Allan W. 2014. «Organic Anion Uptake by Hepatocytes». *Comprehensive*

Physiology 4 (4): 1715–35. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140023>.

- Wolkoff, Allan W., Kirsten L. Johansen, e Tobias Goesser. 1987. «The Isolated Perfused Rat Liver: Preparation and Application». *Analytical Biochemistry* 167 (1): 1–14. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90127-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90127-8).
- Wu, C.C., M.C. Hsu, C.W. Hsieh, J.B. Lin, P.H. Lai, e B.S. Wung. 2006. «Upregulation of Heme Oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-Gallate via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK Pathways». *Life Sciences* 78 (25): 2889–97. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.013>.
- Yamasaki, H., H. Uefuji, e Y. Sakihama. 1996. «Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical.» *Archives of biochemistry and biophysics*. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1996.0331>.
- Yang, K, C Battista, J L Woodhead, S H Stahl, J T Mettetal, P B Watkins, S Q Siler, e B A Howell. 2017. «Systems Pharmacology Modeling of Drug-Induced Hyperbilirubinemia: Differentiating Hepatotoxicity and Inhibition of Enzymes/Transporters.» *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 101 (4): 501–9. <https://doi.org/10.1002/cpt.619>.
- Zelcer, Noam, Koen van de Wetering, Rudi de Waart, George L. Scheffer, Hanns-Ulrich Marschall, Pieter Wielinga, Annemieke Kuil, et al. 2006. «Mice Lacking Mrp3 (Abcc3) Have Normal Bile Salt Transport, but Altered Hepatic Transport of Endogenous Glucuronides». *Journal of Hepatology* 44 (4): 768–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.022>.
- Zemlan, F. P., O. J. Thienhaus, e H. B. Bosmann. 1989. «Superoxide Dismutase Activity in Alzheimer's Disease: Possible Mechanism for Paired Helical Filament Formation». *Brain Research* 476 (1): 160–62. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91550-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91550-3).
- Zerochnik, Eva. 2010. «Protein Conformational Pathology in Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases; New Targets for Therapy». *Current Alzheimer Research* 7 (febbraio): 74–83. <https://doi.org/10.2174/1567209198607282050>.
- Zhang, Kezhong, e Randal J. Kaufman. 2006. «The Unfolded Protein Response: A Stress Signaling Pathway Critical for Health and Disease». *Neurology* 66 (2 Suppl 1): S102–109. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000192306.98198.ec>.
- Zhu, Judy T. T., Roy C. Y. Choi, Glanice K. Y. Chu, Anna W. H. Cheung, Qiu T. Gao, Jun Li, Zhi Y. Jiang, Tina T. X. Dong, e Karl W. K. Tsim. 2007. «Flavonoids Possess Neuroprotective Effects on Cultured Pheochromocytoma PC12 Cells: A Comparison of Different Flavonoids in Activating Estrogenic Effect and in Preventing β -Amyloid-Induced Cell Death». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (6): 2438–45. <https://doi.org/10.1021/jf063299z>.
- Zucker, S. D., W. Goessling, e A. G. Hoppin. 1999. «Unconjugated Bilirubin Exhibits Spontaneous Diffusion through Model Lipid Bilayers and Native Hepatocyte Membranes». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (16): 10852–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10852>.

- Zunszain, Patricia A., Jamie Ghuman, Antony F. McDonagh, e Stephen Curry. 2008. «Crystallographic Analysis of Human Serum Albumin Complexed with 4Z,15E-Bilirubin-IX α ». *Journal of Molecular Biology* 381 (2): 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.016>.
- Zuperl, Spela, Stefano Fornasaro, Marjana Novic, e Sabina Passamonti. 2011. «Experimental Determination and Prediction of Bilirubin Transport Activity.» *Analytica Chimica Acta* 705 (1–2): 322–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.004>.

Ringraziamenti

Ringrazio la mia supervisor, la Prof.ssa Sabina Passamonti per la pazienza, la dolcezza e la disponibilità con cui mi ha insegnato e fatto capire cosa significhi fare Ricerca, dandomi la possibilità di partecipare al progetto Agrotur II.

Ringrazio la mia seconda famiglia, il laboratorio di Nutrizione Molecolare per avermi accolto calorosamente fin dall'inizio ed in particolare:

Un sentito grazie alla Prof.ssa Antonella Bandiera per avermi seguito con dedizione ed entusiasmo durante il mio primo anno di dottorato, trasmettendomi una fondamentale lezione di vita: non mollare mai.

Ringrazio la Prof.ssa Federica Tramer per tutti i consigli che mi ha dato in questi tre lunghi anni e per essere stata una ottima confidente nei momenti di sconforto.

Un sentito grazie anche alla Dott.ssa Paola Sist e alla Dott.ssa Nevenka Medic per aver rallegrato le mie giornate tra una risalta e l'altra e per avermi sempre spronato anche quando i risultati erano negativi.

Ringrazio molto anche il Dott. Marco Stebel per aver avuto sempre una parola dolce al momento giusto o una barzelletta "spiritosa" nei momenti di sconforto.

Un sentito grazie anche la Dott.ssa Andreja Vanzo per avermi dato la possibilità di svolgere una parte della mia attività di ricerca nel suo laboratorio e avermi fatto conoscere e vivere in tutta la sua bellezza la fredda Lubiana.

Non posso non ringraziare anche i miei genitori e mia sorella che mi hanno sempre supportato e sopportato in questo percorso difficile ma ricco di gioie.

Ringrazio ancora una volta Enrico, la parte migliore di me, che anche in questo percorso mi ha sempre spronato ed incoraggiato, stimolandomi ad essere chiunque io voglia essere, giorno dopo giorno senza pregiudizi.

Infine, ringrazio tutti i ragazzi che ho incontrato in questi tre anni (Alberto, Ovidio, Emma, Marco, Matteo, Roberta, Roberto, Gabriele, Deianira, Lusiana, Carlotta e Claudia), con cui ho condiviso l'ansia dei risultati negativi, delle scadenze delle tesi e dei PowerPoint terminati all'ultimo, ma anche la gioia degli aperitivi post laboratorio e delle spensierate serate a Barcola.

Grazie Trieste per questi otto anni meravigliosi, sarai per sempre la mia città del cuore.