Interreg Italia-Slovenija AGROTUR+

Cofinanziato dall'Unione europea
Sofinancira Evropska unija

Risultato tangibile D.2.4.4. Relazione scientifica. Studio pilota - Farmacologia dei polifenoli dell'uva

Federica Tramer, Marco Stebel, Sabina Passamonti

Trieste, 31.12.2025

Oprijemljiv rezultat D.2.4.4. Znanstveno poročilo. Pilotna študija - Farmakologija grozdnih polifenolov

Federica Tramer, Marco Stebel, Sabina Passamonti

Trst, 31.12.2025

Partner di progetto/Projektni partnerji:

Kmetijski inštitut Slovenije
Agricultural Institute of Slovenia

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

CESCOT

ORA

Il progetto AGROTUR+ è co-finanziato dall'Unione europea nell'ambito del Programma Interreg VI-A Italia-Slovenia.
Projekt AGROTUR sofinancira Evropska unija v okviru Programa Interreg VI-A Italija-Slovenija.

www.ita-slo.eu/agrotur

Obiettivi della capitalizzazione	Cilji kapitalizacije
L'attività sperimentale del WP2.4 è tesa a valorizzare i risultati ottenuti nel precedente progetto Agrotur II e pubblicati nell'articolo scientifico intitolato "Cyanidin 3-glucoside targets a hepatic bilirubin transporter in rats" (1), prodotto in collaborazione con il Lead Partner, e pubblicato in una rivista ad alto impatto scientifico (94% percentile nella categoria "Pharmacology"). In questo lavoro abbiamo dimostrato che uno dei pigmenti rossi dell'uva agisce sul trasporto della bilirubina dal sangue al fegato.	Eksperimentalna aktivnost WP2.4 si prizadeva izboljšati rezultate, pridobljene v prejšnjem projektu Agrotur II in objavljene v znanstvenem članku z naslovom »Cianidin 3-glukozid cilja na jetrni transporter bilirubina pri podganah« (1), ki je bil napisan v sodelovanju z vodilnim partnerjem in objavljen v reviji z visokim znanstvenim vplivom (94 % percentil v kategoriji »Farmakologija«). V tem delu smo pokazali, da eden od rdečih pigmentov grozdja deluje na transport bilirubina iz krvi v jetra.
Importanza per il tema Vino & Salute	**Pomen za temo Vino in zdravje**
Questo risultato è molto importante perché questa è l'unica molecola finora nota in grado di rallentare l'entrata della bilirubina nel sangue e, potenzialmente, di indurre un lieve aumento dei livelli di bilirubina nel sangue. Questa condizione, che si osserva tipicamente nella cosiddetta iperbilirubinemia congenita familiare o sindrome di Gilbert (circa 10% della popolazione europea), è associata a riduzione del rischio di malattie cardiovascolari e di morte (2). Perciò la ricerca scientifica nel campo della medicina preventiva sta cercando se esistano interventi nutrizionali che inducano lieve iperbilirubinemia nei soggetti normali. I nostri risultati fanno ipotizzare che almeno alcuni pigmenti dell'uva possano causare lieve e benefica iperbilirubinemia. L'obiettivo scientifico nel WP2.4 è verificare questa ipotesi,	Ta rezultat je zelo pomemben, ker je edina doslej znana molekula, ki lahko upočasni vstop bilirubina v kri in potencialno povzroči rahlo zvišanje ravni bilirubina v krvi. To stanje, ki ga običajno opazimo pri tako imenovani družinski prirojeni hiperbilirubinemiji ali Gilbertovem sindromu (približno 10 % evropske populacije), je povezano z zmanjšanim tveganjem za srčno-žilne bolezni in smrt (2). Zato znanstvene raziskave na področju preventivne medicine iščejo prehranske posege, ki bi pri zdravih osebah povzročili blago hiperbilirubinemijo. Naši rezultati kažejo, da lahko vsaj nekateri pigmenti grozdja povzročijo blago in koristno hiperbilirubinemijo. Znanstveni cilj v WP2.4 je preveriti to hipotezo in s tem prispevati k znanju na področju VINA IN ZDRAVJA.

Partner di progetto/Projektni partnerji:

Il progetto AGROTUR+ è co-finanziato dall'Unione europea nell'ambito del Programma Interreg VI-A Italia-Slovenia.
Projekt AGROTUR sofinancira Evropska unija v okviru Programa Interreg VI-A Italija-Slovenija.

così contribuendo alle conoscenze nel campo VINO & SALUTE.	
Questioni scientifiche	**Znanstvena vprašanja**
Da 2002 in poi, utilizzando diversi modelli sperimentali e facendo leva su sinergie scientifiche con il Lead Partner abbiamo accumulato evidenze scientifiche che almeno alcuni pigmenti dell'uva (detti antociani) possano causare un leggero aumento dei livelli ematici della bilirubina (3) (4)(5)(6) (7), agendo principalmente sul fegato, senza però danneggiarlo. Al contrario, un lieve aumento dei livelli di bilirubina nel sangue riduce il rischio di malattie cardiovascolari, di moralità, di malattie metaboliche, rivoluzionando la visione che la bilirubina sia uno scarto metabolico, mentre invece esercita plurime azioni protettive (antinfiammatoria, antiossidante) con impatti benefici sulla salute (8). In questo progetto, abbiamo esaminato se l'antociano puro cianidina 3-glucoside può modulare i livelli di bilirubinemia nell'animale in vivo. Per motivi metodologici, quest'obiettivo generale è stato suddiviso in tre obiettivi specifici, che si possono descrivere formulando tre diverse domande scientifiche, da affrontare con altrettanti distinti approcci sperimentali. In questo modo abbiamo puntato ad ottenere dati originali, solidi dal punto di vista metodologico ed utili a rafforzare le conoscenze sugli effetti benefici degli antociani.	Od leta 2002 smo z uporabo različnih eksperimentalnih modelov in izkoriščanjem znanstvenih sinergij z vodilnim partnerjem zbrali znanstvene dokaze, da lahko vsaj nekateri pigmenti grozdja (imenovani antocianini) povzročijo rahlo zvišanje ravni bilirubina v krvi (3) (4) (5) (6) (7), pri čemer delujejo predvsem na jetra, ne da bi jih pri tem poškodovali. Nasprotno pa rahlo zvišanje ravni bilirubina v krvi zmanjša tveganje za srčno-žilne bolezni, bolezni srca in presnovne bolezni, kar je revolucionarno spremenilo stališče, da je bilirubin presnovni odpadni produkt. Namesto tega ima več zaščitnih učinkov (protivnetno, antioksidativno) z ugodnimi učinki na zdravje (8). V tem projektu smo preučili, ali lahko čisti antocianin cianidin 3-glukozid in vivo modulira raven bilirubina pri živalih. Iz metodoloških razlogov je bil ta splošni cilj razdeljen na tri specifične cilje, ki jih je mogoče opisati z oblikovanjem treh različnih znanstvenih vprašanj, ki jih je treba obravnavati s tremi različnimi eksperimentalnimi pristopi. Na ta način smo želeli pridobiti izvirne, metodološko utemeljene podatke, ki bi okrepili naše razumevanje koristnih učinkov antocianinov.
Le tre specifiche questioni sono:	**Tri konkretna vprašanja so:**

1. **Gli antociani modificano i livelli basali della bilirubina in vivo?** Se la presenza di antociani nel sangue influenzasse il trasferimento della bilirubina dal sangue al fegato, allora si osserverebbe che i livelli di bilirubina nel sangue oscillerebbe dopo somministrazione di antociani puri nel ratto in vivo, simulando quanto avviene dopo il consumo di alimenti e bevande ricche di antociani. Questa questione è stata affrontata utilizzando il modello in vivo del ratto sotto anestesia profonda, in cui è stata somministrata una dose di antociano puro, secondo il protocollo degli studi di farmacocinetica.	**1. Ali antocianini in vivo spreminjajo raven bazalnega bilirubina?** Če prisotnost antocianinov v krvi vpliva na prenos bilirubina iz krvi v jetra, potem bi raven bilirubina v krvi nihala po dajanju čistih antocianinov podganam in vivo, kar simulira dogajanje po zaužitju hrane in pijače, bogate z antocianini. To vprašanje je bilo obravnavano z uporabo in vivo modela podgane pod globoko anestezijo, pri kateri je bil odmerek čistega antocianina dan v skladu s protokolom za farmakokinetične študije.
2. **Gli antociani modificano l'escrezione epatica della bilirubina?** Dopo il consumo di alimenti e bevande ricche di antociani, questi sono assorbiti dallo stomaco e dall'intestino e raggiungono il fegato che li elimina nella bile. Qui essi potrebbero inibire il riassorbimento della bilirubina nel sangue e facilitare così la sua escrezione nella bile ed aumentare il flusso biliare. D'altra parte, gli antociani nella bile potrebbero essere anch'essi riassorbiti nel sangue, aumentando così la loro biodisponibilità. Questa questione è stata affrontata utilizzando il modello in vivo del ratto sotto anestesia profonda, in cui è stata indotta una breve colestasi (interruzione del flusso biliare, mediante ostruzione del dotto epatico).	**2. Ali antocianini spreminjajo izločanje bilirubina v jetrih?** Po zaužitju hrane in pijače, bogate z antocianini, se ti absorbirajo v želodcu in črevesju ter dosežejo jetra, kjer se izločijo z žolčem. Tam bi lahko zavirali reabsorpcijo bilirubina v kri in tako olajšali njegovo izločanje z žolčem ter povečali pretok žolča. Po drugi strani pa bi se lahko antocianini v žolču tudi reabsorbirali v kri, kar bi povečalo njihovo biološko uporabnost. To vprašanje je bilo obravnavano z uporabo in vivo podganjega modela pod globoko anestezijo, pri katerem je bila povzročena kratkotrajna holestaza (prekinitev pretoka žolča zaradi obstrukcije jetrnega kanala).
3. **Gli antociani modificano il riassorbimento intestinale della bilirubina?** La bile prodotta nel fegato ed escreta nell'intestino contiene sia bilirubina che sali biliari. Una quota importante di bilirubina e di sali biliari viene riassorbita dall'intestino e ritorna al fegato, realizzando un circolo entero-epatico di queste due classi di molecole, che possono attraversare le cellule attraverso comuni trasportatori di membrana. Non è noto se gli antociani utilizzano i meccanismi di trasporto trans-cellulare della bilirubina. Se così fosse, si potrebbero avere delle ripercussioni sulla eliminazione di	**3. Ali antocianini spreminjajo reabsorpcijo črevesnega bilirubina?** Žolč, ki nastane v jetrih in se izloči v črevesje, vsebuje tako bilirubin kot žolčne soli. Pomemben del bilirubina in žolčnih soli se reabsorbira iz črevesja in vrne v jetra, kar povzroči enterohepatično cirkulacijo teh dveh razredov molekul, ki lahko prečkajo celice prek skupnih membranskih prenašalcev. Ni znano, ali antocianini uporabljajo transcelularne mehanizme transporta bilirubina. Če je tako, bi to lahko imelo posledice za izločanje žolčnih komponent v črevesju. Če bi antocianini zavirali enterohepatično cirkulacijo žolčnih soli (skupaj z bilirubinom), bi se te izločale v večjih količinah. Da bi nadomestili to izgubo, bi se povečala jetrna sinteza žolčnih soli iz holesterola in s tem ugoden

componenti della bile nell'intestino. Se gli antociani inibissero il circolo entero-epatico dei sali biliari (insieme a quello della bilirubina), questi sarebbero eliminati in maggiore quantità. Per compensare questa perdita ci sarebbe un aumento della sintesi epatica di sali biliari a partire dal colesterolo, e perciò un effetto favorevole di abbassamento dei livelli di colesterolo nel sangue. Una metanalisi di 21 studi clinici ha indicato che integrare la dieta con antociani riduce il rischio di sindrome metabolica ed abbassa i livelli ematici di LDL-colesterolo (il colesterolo "cattivo") (9). Le interazioni tra trasporto di antociani e bilirubina nell'epitelio intestinale sono state esaminate usando colture cellulari in vitro.	učinek znižanja ravni holesterola v krvi. Metaanaliza 21 kliničnih študij je pokazala, da dopolnjevanje prehrane z antocianini zmanjšuje tveganje za metabolni sindrom in znižuje raven LDL-holesterola (»slabega« holesterola) v krvi (9). Interakcije med transportom antocianinov in bilirubinom v črevesnem epiteliju so bile preučene z uporabo celičnih kultur in vitro.
Approcci sperimentali	**Eksperimentalni pristopi**
Per dare risposta a queste tre questioni, abbiamo utilizzato **tre diversi approcci sperimentali**, che si descrivono sotto nell'ordine della loro complessità metodologica. Il primo è stato realizzato su un modello cellulare in vitro. Il secondo e terzo sono stati realizzati nel ratto anestetizzato, un modello animale in vivo. Questo progetto è stato autorizzato dalle autorità bioetiche competenti (Ministero della Salute, aut. n° 166/2022-PR; codice interno all'Università di Trieste 269PAS22). Nel novembre 2024 abbiamo ottenuto l'autorizzazione a continuare la sperimentazione, dopo la valutazione intermedia dei risultati del progetto (Prot. 0033372-13/11/2024-DGSAF-MDS-P).	Za odgovor na ta tri vprašanja smo uporabili **tri različne eksperimentalne pristope**, ki so opisani spodaj po vrstnem redu njihove metodološke zahtevnosti. Prvi je bil izveden na celičnem modelu in vitro. Drugi in tretji sta bila izvedena na anesteziranih podganah, živalskem modelu in vivo. Ta projekt so odobrili pristojni bioetični organi (Ministrstvo za zdravje, št. dovoljenja 166/2022-PR; interna koda Univerze v Trstu 269PAS22). Novembra 2024 smo po vmesni oceni rezultatov projekta pridobili dovoljenje za nadaljevanje preskušanja (Prot. 0033372-13/11/2024-DGSAF-MDS-P).
1. Colture cellulari in vitro	***1. Celične kulture in vitro***
Per capire se gli antociani modificano il riassorbimento intestinale della bilirubina sia influenzato dagli antociani, abbiamo utilizzato il modello sperimentale delle cellule Caco-2 (cellule intestinali umane immortalizzate) fatte crescere su c.d. TRANSWELL, un dispositivo con due	Da bi razumeli, ali antocianini vplivajo na reabsorpcijo bilirubina v črevesju, smo uporabili eksperimentalni model celic Caco-2 (imortaliziranih človeških črevesnih celic), vzgojenih na tako imenovanem TRANSWELL-u, napravi z dvema predelkoma, ločenima s

compartimenti separati da un setto poroso su cui crescono e maturano le cellule Caco-2. In un compartimento, che simula l'ambiente interno dell'intestino (lume intestinale), si mette una soluzione contenente bilirubina, con o senza antociani puri. Nell'altro compartimento, che simula il sangue, si mette una soluzione semplice. La bilirubina diffonde attraverso lo stato cellulare e si può misurare la sua comparsa nel compartimento ricevente prelevandone dei campioni per le analisi.	porozno pregrado, na kateri rastejo in dozorevajo celice Caco-2. V enem predelku, ki simulira notranje okolje črevesja (črevesni lumen), je nameščena raztopina, ki vsebuje bilirubin, s čistimi antocianini ali brez njih. V drugem predelku, ki simulira kri, je nameščena preprosta raztopina. Bilirubin difundira skozi celično plast, njegov pojav v prejemnem predelku pa je mogoče izmeriti z odvzemom vzorcev za analizo.
 **Figura 1.** *Schema del dispositivo TRANSWELL.* ***Slika 1.*** *Shema naprave TRANSWELL. Rumena: raztopina bilirubina. Celična plast Caco-2 na filtru. Svetlo modra: raztopina za analizo*	
2. Effetto dell'iniezione intravenosa di cianidina 3-glucoside sulla funzione epatica	***2. Vpliv intravenske injekcije cianidin 3-glukozida na delovanje jeter***
Per capire se gli antociani interferiscono con il trasporto epatico della bilirubina abbiamo usato una classica prova di farmacocinetica intravenosa, con cui si inietta una dose di farmaco o sostanza naturale (cianidina 3-glucoside) e si verifica la concentrazione ematica del farmaco o suoi metaboliti.	Da bi razumeli, ali antocianini vplivajo na transport bilirubina v jetrih, smo uporabili klasični intravenski farmakokinetični test, pri katerem se injicira odmerek zdravila ali naravne snovi (cianidin 3-glukozid) in preveri koncentracija zdravila ali njegovih presnovkov v krvi.

3. Effetto dell'iniezione intrabiliare di cianidina 3-glucoside sulla funzione epatica	***3. Učinek intrabiliarne injekcije cianidin 3-glukozida na delovanje jeter***
Per capire se ci sia interferenza reciproca tra assorbimento biliare degli antociani e della bilirubina, abbiamo iniettato nel dotto epatico della bile che contiene le due specie di bilirubina, quella libera e quella coniugata, insieme con la ciandina 3-glucoside. Contemporaneamente, abbiamo misurato la bilirubina frazionata (le due specie di bilirubina) in microcampioni di sangue. Aliquote sono state predisposte per le analisi di cianidina 3-glucoside a cura del Lead partner. Abbiamo fatto numerosi controlli, per la caratterizzazione del modello sperimentale e la corretta interpretazione dei dati. I risultati ottenuti con questo approccio sperimentale possono essere confrontati con quelli ottenuti usando le colture cellulari sul dispositivo transwell.	Da bi ugotovili, ali obstaja recipročna interferenca med absorpcijo antocianinov in bilirubina v žolču, smo v jetrni vod injicirali žolč, ki je vseboval tako proste kot konjugirane vrste bilirubina, skupaj s cianidin 3-glukozidom. Hkrati smo v mikrovzorcih krvi merili frakcionirani bilirubin (obe vrsti bilirubina). Vodilni partner je pripravil alikvote za analizo cianidin 3-glukozida. Izvedli smo številne kontrole za karakterizacijo eksperimentalnega modela in zagotovitev pravilne interpretacije podatkov. Rezultate, pridobljene s tem eksperimentalnim pristopom, je mogoče primerjati s tistimi, pridobljenimi z uporabo celičnih kultur na napravi Transwell.
Tecniche analitiche	**Analitične tehnike**
Le tecniche analitiche che consentono di raggiungere l'obiettivo del progetto di sperimentazione animale sono: a) micro-analisi fluorimetrica della bilirubinemia frazionata; b) analisi HPLC-MS degli antociani nel sangue. Per quest'ultima è necessaria la collaborazione con il LP.	Analitične tehnike, ki nam omogočajo doseganje cilja projekta testiranja na živalih, so: a) fluorimetrična mikroanaliza frakcioniranega bilirubina; b) HPLC-MS analiza antocianinov v krvi. Za slednje je potrebno sodelovanje z LP.
Microanalisi della bilirubinemia	***Mikroanaliza bilirubinemije***
Questo metodo analitico molto efficiente è stato sviluppato ed usato nel progetto Agrotur II (1) e in seguito è stato standardizzato (10). Esso si basa sulla produzione nel nostro gruppo di lavoro di un polipeptide, chiamato HUG (11), che lega solo la bilirubina ed emette un segnale misurabile di fluorescenza. In questo progetto e nell'ambito del WP2.4 abbiamo standardizzato sia la produzione di HUG (12) che la preparazione di soluzioni di bilirubina pura, da utilizzare come riferimento per la calibrazione delle misure (13)	Ta zelo učinkovita analitska metoda je bila razvita in uporabljena v projektu Agrotur II (1) ter nato standardizirana (10). Temelji na proizvodnji polipeptida, imenovanega HUG (11), v naši delovni skupini, ki veže samo bilirubin in oddaja merljiv fluorescenčni signal. V tem projektu in v okviru WP2.4 smo standardizirali tako proizvodnjo HUG (12) kot tudi pripravo čistih raztopin bilirubina, ki se uporabljajo kot referenca za kalibracijo meritev (13). To specifično delo je izkoristilo predhodno pridobljene rezultate in deluje v sinergiji s

Questo specifico lavoro ha capitalizzato risultati ottenuti in precedenza e opera in sinergia con il progetto iNEST, citato nella proposta progettuale (sezione C.2.6). Inoltre, coinvolge altre risorse umane (1 assegnista di ricerca/tecnologo; 1 studentessa PhD).	projektom iNEST, ki je naveden v predlogu projekta (oddelek C.2.6). Poleg tega vključuje dodatne človeške vire (1 raziskovalni sodelavec/tehnolog; 1 doktorski študent).
Prove pilota	**Pilotni testi**
1. Effetto degli antociani sui livelli basali di bilirubina	***1. Vpliv antocianinov na raven bazalnega bilirubina***
La BR entra nel fegato molto rapidamente, come dimostrabile dal fatto che l'iniezione intravenosa di una dose di BR scompare in pochissimi minuti. Abbiamo messo a punto il metodo per realizzare l'esperimento, standardizzando la procedura chirurgica, la raccolta cronometrata del sangue arterioso e l'iniezione endovenosa delle molecole (bilirubina e C3G). Abbiamo realizzato esperimenti di farmacocinetica, coinvolgendo 1 studentessa (Alexandra Cristina Duhnic) che ha svolto il suo tirocinio pratico per la tesi di laurea magistrale a ciclo unico in Farmacia. A pagina 15 della tesi di laurea di A.C. Duhnic, una tabella descrive i 24 esperimenti, le condizioni sperimentali e le rispettive basi razionali (**Tabella 1**):	BR zelo hitro vstopi v jetra, kar dokazuje dejstvo, da intravenska injekcija odmerka BR izgine v nekaj minutah. Razvili smo metodo za izvedbo poskusa, standardizacijo kirurškega postopka, časovno omejen odvzem arterijske krvi in intravensko injiciranje molekul (bilirubina in C3G). Izvedli smo farmakokinetične poskuse, v katere je bila vključena študentka (Alexandra Cristina Duhnic), ki je opravila praktično prakso za magistrsko delo iz farmacije. Na 15. strani diplomskega dela A.C. Duhnic tabela opisuje 24 poskusov, eksperimentalne pogoje in njihove ustrezne utemeljitve (**Tabela 1**):

Table 1. Experimental groups and rationale. *Division of animals into experimental groups according to the type and sequence of intravenous boluses administered. For each group, the administered dose, the n of animals (n) and the rationale are indicated.*

Group	bolus I	Dose	bolus II	Dose	Rationale
A	BR	3 (n=1), 5.5 (n=1), 11 (n=1), or 22 (n=3) nmol			obtain basic PK parameters of BR elimination
B	BR	3 (n=1), 5.5 (n=1), 11 (n=1), or 22 (n=2) nmol	BR	3 (n=1), 5.5 (n=1), 11 (n=1), or 22 (n=2) nmol	obtain duplicate, basic PK parameters of BR elimination in the same rat (3R principle)
C	C3G	0.67 (n=3) or 1.67 (n=1) µM	C3G	0.67 (n=3) µmol	obtain basic PK parameters of the elimination of C3G
D	BR, C3G	3 (n=1) or 22 (n=2)nmol BR, 2 µM C3G			obtain basic PK parameters of BR elimination in the presence of C3G, assuming the latter would inhibit the hepatic uptake of BR
E	BR, C3G	3 (n=1) or 22 (n=2) nmol BR, 2 µM C3G	BR	3 (n=1) or 22 (n=2) nmol	obtain basic PK parameters of BR elimination in the presence or absence of C3G, assuming that the first dose of BR would be eliminated after a time equal to 5 • t/2.
F	BR	22 (n=1) nmol	C3G	2 (n=1) µmol	obtain basic PK parameters of BR elimination; obtain basic PK parameters of C3G assuming that the first dose of BR would be eliminated after a time equal to 5 • t/2
G	C3G	2 (n=1) µmol	BR, C3G	22 nmol BR, 2 µmol C3G (n=1)	Verify if C3G modulates basal, fractionated bilirubinemia

Tabella 1. *Schema delle prove sperimentali di farmacocinetica.*
Tabela 1. *Shema eksperimentalnih farmakokinetičnih testov.*

I campioni ematici raccolti sono stati analizzati per misurare sia la bilirubina frazionata, presso la nostra sede, che la cianidina 3-glucoside e i suoi prodotti metabolici, a cura del Lead partner (dott.ssa Andreja Vanzo, Kmetijski inštitut Slovenije).

Tutti i dati di bilirubina frazionata ottenuti dagli esperimenti sono riportati nella Figura a pagina 26 della tesi. La **figura 1** mostra che concentrazione di bilirubina (BR, rosso) nel sangue cresce immediatamente dopo la sua iniezione endovenosa e poi scende a valori costanti, ma non sempre pari a quelli iniziali. La bilirubina glucuronide (prodotto del metabolismo epatico, blu) non si modifica.

Zbrane vzorce krvi je vodilna partnerica (dr. Andreja Vanzo, Kmetijski inštitut Slovenije) analizirala tako na frakcionirani bilirubin v naši ustanovi kot tudi na cianidin 3-glukozid in njegove presnovne produkte.

Vsi podatki o frakcioniranem bilirubinu, pridobljeni s poskusi, so prikazani na sliki na strani 26 diplomskega dela. **Slika 1** kaže, da se koncentracija bilirubina (BR, rdeč) v krvi takoj po intravenski injekciji poveča in nato zmanjša na konstantne vrednosti, vendar ne vedno na začetne vrednosti. Bilirubin glukuronid (produkt jetrne presnove, moder) se ne spreminja.

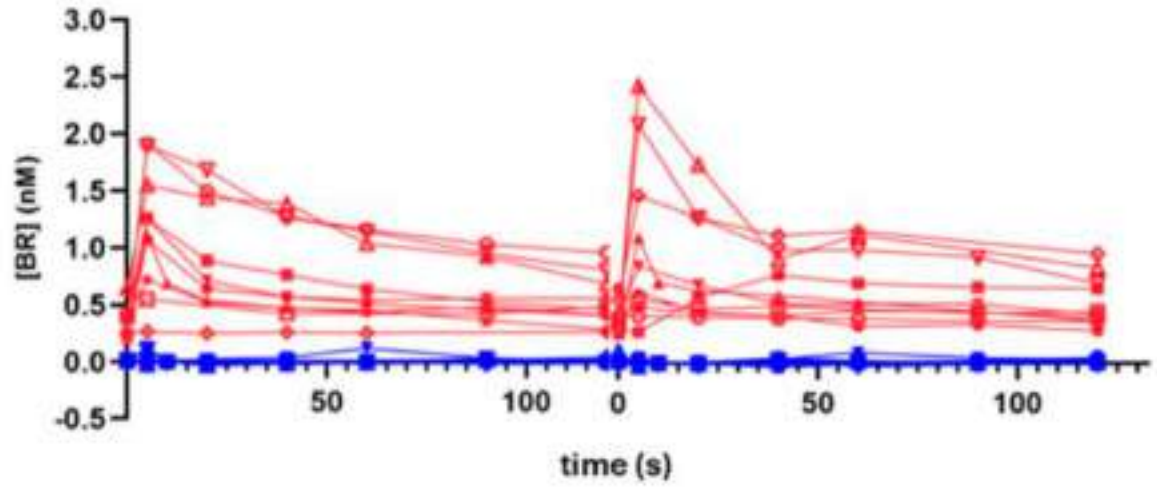


Fig. 23: ***Fractionated blood bilirubin time-profile after two consecutive i.v. boli***
The blood concentration of BR (red) and BRG (blue) were measured at time intervals following the i.v. administration of either one or two boli of 0.12 mL, 0.15 mL or 0.25 mL of BR at the concentrations indicated in Table 1, groups A-G. The solvent was PBS:DMSO (2:8, vol:vol). Symbols represent individual experiments. A different time interval occurred between the first and second bolus (10' or 15') compatible with the experiment design.

Figura 1. Profilo farmacocinetico della bilirubina nel ratto
Slika 1. Farmakokinetični profil bilirubina pri podganah

Tutti i dati di BR sono stati utilizzati per calcolare i due principali parametri farmacocinetici, la concentrazione massima (Cmax) e l'esposizione alla BR (area under the curve, AUC). I parametri sono presentati nella tabella 2 a pagina 27 della tesi (**Tabella 2**):	Vsi podatki BR so bili uporabljeni za izračun dveh glavnih farmakokinetičnih parametrov, največje koncentracije (Cmax) in izpostavljenosti BR (površina pod krivuljo, AUC). Parametri so predstavljeni v tabeli 2 na strani 27 diplomskega dela (**Tabela 2**):

Table 2: Pharmacokinetic parameters of bilirubin obtained from one-phase decay fits.
Parameters extracted from individual concentration–time profiles include baseline (pre-dose) blood bilirubin concentration, Cmax, Tmax, AUC (0–t), elimination rate constant (k), half-life ($t_{½}$), and R^2, reported for each experimental group as defined in Table 1.

Group	BR dose	Exp. #	basal [BR]	C max (µM)	T max (s)	AUC (µM)	Elimination rate		t/2
							Ke (s^{-1})	R^2	
A	22 nmol	#1	215.69	1.07	5	63.12	0.067	0.97	10.4
		#2	242.07	1.26	5	78.66	0.030	0.98	22.8
		#9	376.11	1.91	5	140.15	0.032	0.99	21.9
		Mean		1.41	5	93.98	0.043	0.98	18.4
	11 nmol	#3	206.91	1.11	5	53.71	0.092	0.96	7.6
	5.5 nmol	#4	408.16	1.26	5	71.71	0.098	1.00	7.1
	3 nmol	#5	390.29	0.72	5	55.40	0.083	0.95	8.3
B	22 nmol	#1	746.72	0.56	5	48.34	0.014	0.94	50.2
		#2	320.81	0.89	40	85.66	0.100	0.92	6.9
		Mean		0.72	5	67.00	0.057	0.93	28.6
	11 nmol	#3	294.18	1.26	5	73.00	0.064	0.94	10.9
	5.5 nmol	#4	476.6	0.97	5	72.85	0.044	0.96	15.9
	3 nmol	#5	415.95	0.70	5	59.66	0.153	0.91	4.5
C	0	#11	281.11	0.28	120	31.49	0.714	0.88	1.0
	0	#12	225.89	0.23	60	25.42	0.088	0.26	7.9
	0	#10	252.5	0.26	5	29.32	1.182	0.31	0.6
	0	#11	272.46	0.28	40	30.48	0.005	0.13	152.5
	0	#12	379.10	0.43	40	47.63	0.036	0.78	19.1
		Mean		0.30	53	32.87	0.405	0.47	36.2
D	22 nmol	#7	643.85	1.55	5	126.56	0.003	0.96	265.0
		#8	355.44	1.90	5	136.48	0.018	0.99	39.2

		Mean		1.72	5	131.52	0.010	0.98	152.1
	3 nmol	#6	399.69	0.55	5	49.79	0.741	0.69	0.9
E	22 nmol	#7	453.3	2.78	5	168.18	0.050	0.95	14.0
		#8	396.52	2.39	5	138.48	0.066	0.97	10.6
		Mean		2.59	5	153.33	0.058	0.96	12.3
	3 nmol	#6	401.43	0.64	5	59.40	0.082	0.94	8.4
F	22 nmol	#9	471.93	0.48	5	50.75	0.005	0.97	132.9
G	22 nmol	#10	634.45	1.68	5	14.74	0.025	0.94	27.6

Tabella 2. Parametri farmacocinetici della bilirubina somministrata endovena.
Tabela 2. Farmakokinetični parametri intravensko apliciranega bilirubina.

Il risultato principale di questo studio è che **l'iniezione endovenosa di cianidina 3-glucoside non modifica la concentrazione ematica basale di bilirubina.**

L'analisi degli antociani eseguita su alcune serie di campioni dal LP (consegnati a mano da PP2 a LP, missione a Lubiana dd. 23.05.2024), nei quali sono stati analizzate le concentrazioni di C3G ed alcuni suoi metaboliti (**Figura 2**), dimostra che la C3G non può rallentare l'entrata della bilirubina nel fegato, perché non raggiunge la concentrazione efficace, paragonabile a quanto osservato nel fegato isolato e perfuso (1) nel corso del progetto Agrotur II. La velocità di eliminazione della cianidina 3-glucoside dal sangue è così rapida e completa, da non interferire istantaneamente con il trasporto della bilirubina nel fegato. Nel corso di queste prove abbiamo osservato che la cianidina 3-glucoside veniva eliminata nelle urine, che si tingevano di viola qualche minuto dopo l'iniezione endovenosa. In alcuni casi, le urine presentavano un sedimento proteico e in un caso c'era forte ematuria (presenza di sangue).

Glavna ugotovitev te študije je, da intravenska injekcija cianidin 3-glukozida ne spremeni izhodiščne koncentracije bilirubina v krvi.

Analiza antocianinov, opravljena na več serijah vzorcev iz LP (ročno dostavljenih s strani PP2 v LP, misija v Ljubljano z dne 23. 5. 2024), v kateri so bile analizirane koncentracije C3G in nekaterih njegovih metabolitov, kaže, da C3G ne more upočasniti vstopa bilirubina v jetra (**slika 2**), ker ne doseže učinkovite koncentracije, primerljive s tisto, ki je bila opažena v izoliranih in perfuziranih jetrih (1) med projektom Agrotur II. Hitrost izločanja cianidin 3-glukozida iz krvi je tako hitra in popolna, da ne vpliva takoj na transport bilirubina v jetra. Med temi poskusi smo opazili, da se je cianidin 3-glukozid izločil z urinom, ki se je nekaj minut po intravenski injekciji obarval vijolično. V nekaterih primerih je urin vseboval beljakovinsko usedlino, v enem primeru pa je bila prisotna huda hematurija (prisotnost krvi).

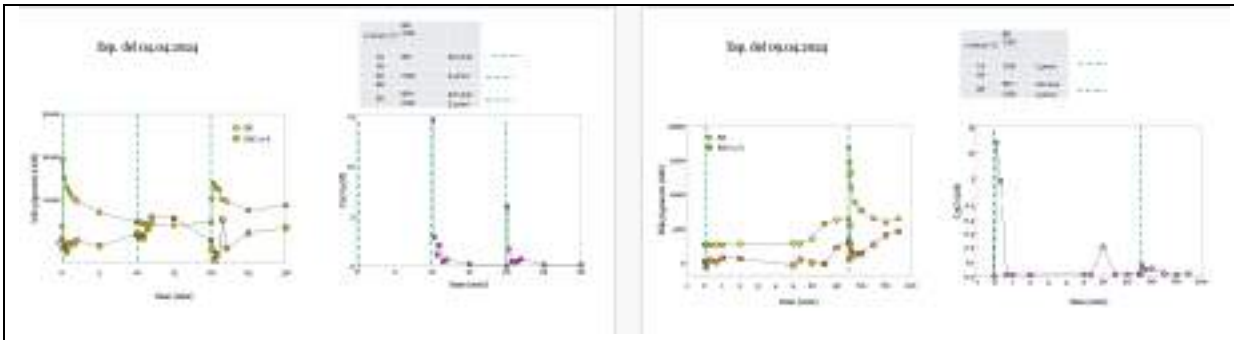


Figura 2. *Analisi accoppiata della bilirubina frazionata (BR e BRG, eseguite da PP2) e della C3G (eseguita da LP) in 2 esperimenti di farmacocinetica della bilirubina (realizzati da PP2).*
Slika 2. *Sklopljena analiza frakcioniranega bilirubina (BR in BRG, izvedena s PP2) in C3G (izvedena z LP) v dveh farmakokinetičnih poskusih z bilirubinom (izvedenih s PP2).*

Abbiamo però fatto un'osservazione molto interessante, che consiste nel fatto che se la bilirubina basale è più elevata, anche l'esposizione (AUC) dell'organismo alla bilirubina somministrata aumenta, come si vede nella figura 19 (linea rossa) a pagina 28 della tesi (**Figura 3**):	Vendar smo naredili zelo zanimivo opažanje, ki se kaže v tem, da se izpostavljenost (AUC) organizma danemu bilirubinu poveča tudi, če je bazalni bilirubin višji, kot je razvidno iz slike 19 (rdeča črta) na strani 28 diplomskega dela (**slika 3**):

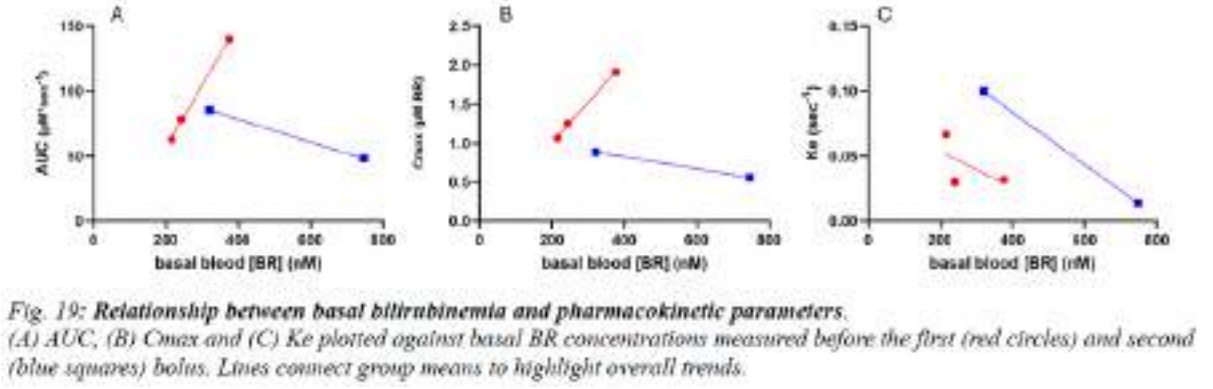


Fig. 19: ***Relationship between basal bilirubinemia and pharmacokinetic parameters.***
(A) AUC, (B) Cmax and (C) Ke plotted against basal BR concentrations measured before the first (red circles) and second (blue squares) bolus. Lines connect group means to highlight overall trends.

Figura 3. *Relazione tra i valori basali della bilirubina e i parametri farmacocinetici.*
Slika 3. *Razmerje med izhodiščnimi vrednostmi bilirubina in farmakokinetičnimi parametri.*

Questo dato indica una minor capacità epatica di eliminare la bilirubina, quando i suoi livelli basali sono più elevati, ancorché nella norma. Tuttavia, la previa somministrazione di cianidina 3-glucoside (linea blu) ha invertito questa tendenza, indicando che questo antociano o alcuni dei suoi metaboliti possono aumentare la funzionalità epatica nei riguardi dell'eliminazione della bilirubina. Questi riscontri sperimentali sono molto importanti per capire l'interazione tra antociani	Ta ugotovitev kaže na zmanjšano sposobnost jeter za izločanje bilirubina, ko so bazalne ravni višje, tudi če so znotraj normalnega območja. Vendar pa je predhodno dajanje cianidin 3-glukozida (modra črta) ta trend obrnilo, kar kaže, da lahko ta antocianin ali nekateri njegovi presnovki povečajo delovanje jeter pri izločanju bilirubina. Te eksperimentalne ugotovitve so zelo pomembne za razumevanje interakcije med

ed organismo animale. Si possono ricavare i seguenti principi: 1. **La cianidina 3-glucoside, iniettata endovena alla dose di 0.37 µg/kg può indurre danni renali,** nonostante sia stata dichiarata non tossica se iniettata nel peritoneo (via alternativa a quella endovenosa, a rapido assorbimento, a dosi molto maggiori (30 mg/kg) (14) 2. **La cianidina 3-glucoside viene rapidamente eliminata per via urinaria e le residue concentrazioni ematiche non possono influenzare il trasporto della bilirubina nel fegato.** Letto in chiave di adattamento dell'animale all'ambiente e alla dieta, questo dato indica che gli antociani "devono" essere eliminati prima di raggiungere livelli significativi nel sangue, per non interferire con l'equilibrio fisiologico. Se gli animali si sono adattati ad eliminare questi componenti vegetali, significa che ciò preserva la salute e la funzionalità dell'animale. Perciò, non è sensato o, meglio, è addirittura controproducente forzare l'assorbimento gastro-intestinale degli antociani con elevate quantità di alimenti che ne sono ricchi, tanto più se si tratta di bevande alcoliche. 3. **La cianidina 3-glucoside migliora la capacità del fegato di eliminare la bilirubina**. Questi dati saranno riportati in una pubblicazione scientifica congiunta con il LP, dato il suo contributo molto importante nel determinare la concentrazione ematica di antociani. Tutti i dati analitici e relativi protocolli sono archiviati nel server del Dipartimento di Scienze della vita, cartella Nutrizione.	antocianini in živalskim organizmom. Iz tega je mogoče sklepati na naslednja načela: **1. Cianidin 3-glukozid, injiciran intravensko v odmerku 0,37 µg/kg, lahko povzroči poškodbo ledvic,** čeprav je bil razglašen za netoksičnega, če se injicira v peritoneum (alternativna pot intravenski, s hitro absorpcijo, pri veliko višjih odmerkih (30 mg/kg) (14). **2. Cianidin 3-glukozid se hitro izloči z urinom in preostale koncentracije v krvi ne morejo vplivati na transport bilirubina v jetra.** Če to beremo v smislu prilagoditve živali okolju in prehrani, ti podatki kažejo, da je treba antocianine "izločiti", preden dosežejo pomembne ravni v krvi, da ne bi motili fiziološkega ravnovesja. Če so se živali prilagodile na izločanje teh rastlinskih sestavin, to pomeni, da to ohranja zdravje in funkcionalnost živali. Zato ni smiselno ali, bolje rečeno, celo kontraproduktivno je siliti absorpcijo antocianinov v prebavilih. Antocianini so v velikih količinah prisotni v živilih, bogatih z njimi, zlasti v alkoholnih pijačah. **3. Cianidin 3-glukozid izboljša sposobnost jeter za odstranjevanje bilirubina.** Ti podatki bodo objavljeni v skupni znanstveni publikaciji z LP, glede na njegov ključni prispevek k določanju koncentracij antocianinov v krvi. Vsi analitični podatki in povezani protokoli so shranjeni na strežniku Oddelka za bioznanosti, v mapi Prehrana.
2. Effetto degli antociani sull'escrezione epatica della bilirubina	***2. Vpliv antocianinov na izločanje bilirubina v jetrih***

La bilirubina (BR) viene eliminata nella bile, sotto forma di bilirubina glucuronide (BRG). Non si sa se la BRG sia riassorbita dalle vie biliari al sangue, come osservato con altri componenti della bile come i sali biliari e se gli antociani interferiscano con questo processo. Abbiamo messo a punto la procedura chirurgica nel ratto anestetizzato, che ci consentiva la raccolta cronometrata di microvolumi di sangue (1-2 gocce in uscita da un sottile catetere inserito nell'arteria femorale) per monitorare le concentrazioni ematiche della bilirubina frazionata (libera e coniugata, BR e BRG) dopo l'iniezione intrabiliare di cianidina 3-glucoside e/o bile nelle vie biliari. Abbiamo eseguito 43 esperimenti, con i quali abbiamo controllato che: 1. Una breve ostruzione del dotto epatico determina un aumento ematico di bilirubina coniugata, reversibile se si libera l'ostruzione. Pertanto, la manovra non danneggia il fegato (**Figura 4**). La figura 4 mostra anche che la risposta biologica all'arresto del flusso biliare (colestasi, in termini tecnici) è molto variabile da animale ad animale.	Bilirubin (BR) se izloča z žolčem v obliki bilirubin glukuronida (BRG). Ni znano, ali se BRG reabsorbira iz žolčnih vodov v kri, kot je bilo opaženo pri drugih žolčnih komponentah, kot so žolčne soli, in ali antocianini motijo ta proces. Razvili smo kirurški postopek pri anesteziranih podganah, ki nam je omogočil pravočasno zbiranje mikrovolumnov krvi (1–2 kapljici, ki izstopata iz tankega katetra, vstavljenega v femoralno arterijo) za spremljanje koncentracij frakcioniranega bilirubina (prostega in konjugiranega, BR in BRG) v krvi po intrabiliarni injekciji cianidin 3-glukozida in/ali žolča v žolčne vode. Izvedli smo 43 poskusov, v katerih smo potrdili, da: 1. Kratkotrajna obstrukcija jetrnega voda povzroči povečanje konjugiranega bilirubina v krvi, kar je reverzibilno, če se obstrukcija odpravi. Zato manever ne poškoduje jeter (**slika 4**). Slika 4 prav tako kaže, da se biološki odziv na zaustavitev pretoka žolča (holestaza, tehnično gledano) zelo razlikuje od živali do živali.

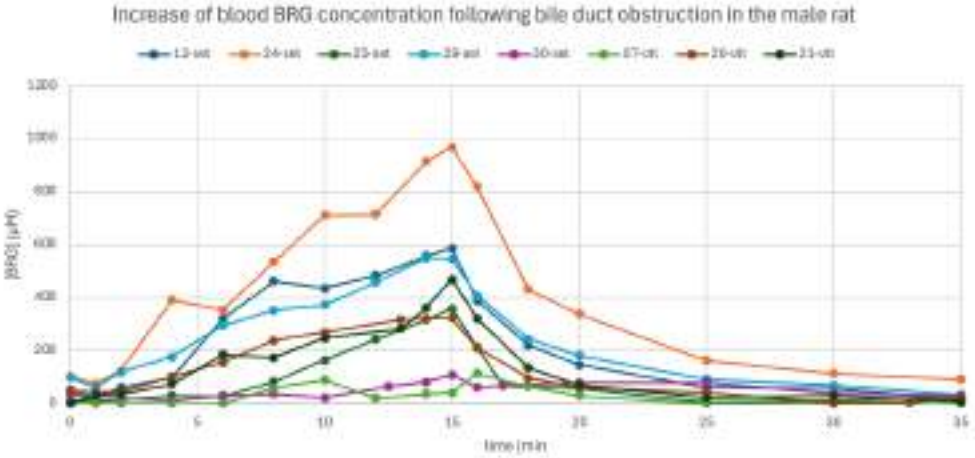


Figura 4. *Aumento della bilirubina coniugata (BRG) nel sangue in seguito al blocco del flusso biliare da 0 a 15 min ottenuto mediante ostruzione del dotto epatico in 8 diversi animali.*
Slika 4. *Povečanje konjugiranega bilirubina (BRG) v krvi po blokadi pretoka žolča od 0 do 15 minut, doseženi z obstrukcijo jetrnega voda pri 8 različnih živalih.*

2. L'iniezione intrabiliare di bile determina un rapido e marcato aumento ematico di bilirubina coniugata, non solo maggiore della semplice ostruzione del dotto biliare, ma anche	2. Intrabiliarna injekcija žolča povzroči hitro in izrazito povečanje konjugiranega bilirubina v krvi, ki ni le večje kot pri preprosti obstrukciji žolčevoda, ampak je tudi takojšnje. Povečanje je

immediato. Anche in questo caso, l'aumento è reversibile se si libera l'ostruzione. Pertanto, anche questa manovra non danneggia il fegato (Figura 5).	tudi reverzibilno, če se obstrukcija odpravi. Zato ta manever tudi ne poškoduje jeter (slika 5).

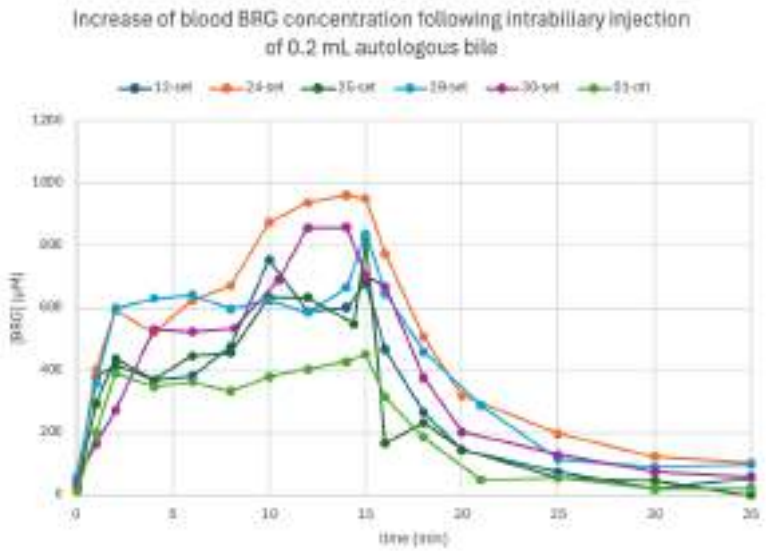


Figura 5. *Aumento della bilirubina coniugata (BRG) nel sangue in seguito all'iniezione intrabiliare di 0.2 mL di bile mantenendo il blocco del flusso biliare da 0 a 15 min in 6 diversi animali.*
Slika 5. *Povečanje konjugiranega bilirubina v krvi (BRG) po intrabiliarni injekciji 0,2 ml žolča ob ohranjanju blokade pretoka žolča od 0 do 15 minut pri 6 različnih živalih.*

3. L'iniezione intrabiliare di una soluzione salina che riproduce le caratteristiche osmotiche della bile causa un ridotto aumento ematico di bilirubina coniugata, dimostrando che quest'ultimo è da attribuire al **riassorbimento di bilirubina coniugata dalle vie biliari nel sangue** (**Figura 6**).	3. Intrabiliarna injekcija fiziološke raztopine, ki reproducira osmotske lastnosti žolča, povzroči zmanjšano povečanje konjugiranega bilirubina v krvi, kar dokazuje, da je slednji posledica **reabsorpcije konjugiranega bilirubina iz žolčevoda v kri** (**slika 6**).

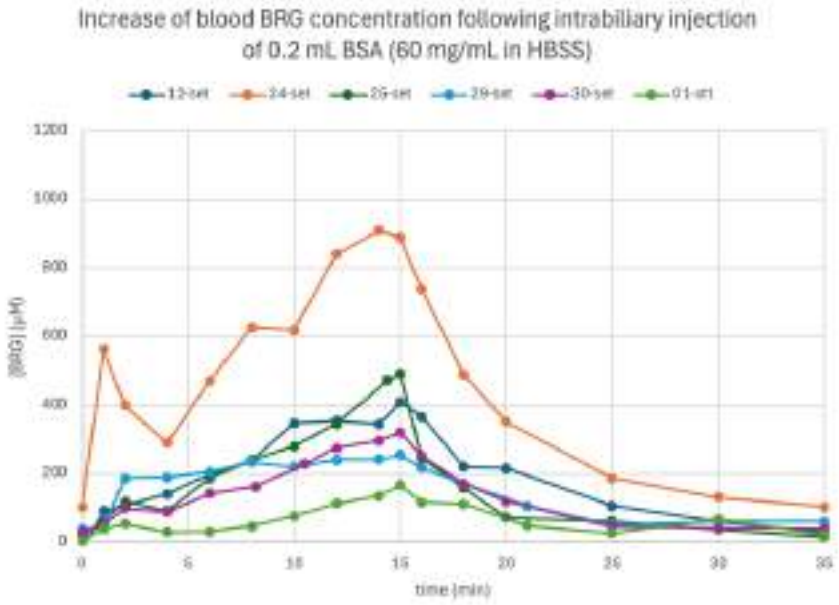


Figura 6. *Aumento della bilirubina coniugata (BRG) nel sangue in seguito all'iniezione intrabiliare di 0.2 mL di una soluzione proteica priva di bile mantenendo il blocco del flusso biliare da 0 a 15 min in 6 diversi animali.*

Slika 6. *Povečanje konjugiranega bilirubina v krvi (BRG) po intrabiliarni injekciji 0,2 ml raztopine beljakovin brez žolča ob ohranjanju blokade pretoka žolča od 0 do 15 minut pri 6 različnih živalih.*

4. Quando bile, contente anche la cianidina 3-glucoside è stata iniettata nel dotto epatico e il flusso biliare è stato bloccato per alcuni minuti, la bile recuperata al rilascio conteneva visibilmente minori quantità del pigmento, dimostrando che **la cianidina 3-glucoside era stata riassorbita dalle vie biliari al fegato e forse al sangue.** Sono ancora in corso le misure analitiche e le valutazioni quantitative, che saranno completate dopo il termine di questo progetto.

Oltre a questi dati, abbiamo anche quantificato bilirubina, bilirubina glucuronide e cianidina 3-glucoside e i suoi metaboliti nei campioni di bile raccolti ogni 5 minuti durante tutto l'esperimento. Sono in corso le misure analitiche sui campioni contenti cianidina 3-glucoside e le valutazioni quantitative.

La realizzazione di queste prove ha richiesto un grande lavoro di standardizzazione del modello sperimentale, reso necessario dalla elevata variabilità individuale della risposta biologica. In tutti gli animali in cui sono stati ottenuti i dati

4. Ko je bil žolč, ki je prav tako vseboval cianidin 3-glukozid, injiciran v jetrni vod in je bil pretok žolča za nekaj minut blokiran, je žolč, ki se je sprostil, vseboval vidno zmanjšane količine pigmenta, kar dokazuje, da se je **cianidin 3-glukozid ponovno absorbiral iz žolčnih vodov v jetra in morda v kri.** Analitične meritve in kvantitativne ocene še vedno potekajo in bodo zaključene po koncu tega projekta.

Poleg teh podatkov smo v vzorcih žolča, ki smo jih zbirali vsakih 5 minut med poskusom, kvantificirali tudi bilirubin, bilirubin glukuronid in cianidin 3-glukozid ter njegove presnovke. Analitične meritve vzorcev, ki vsebujejo cianidin 3-glukozid, in kvantitativne ocene še potekajo.

Izvedba teh poskusov je zahtevala obsežno standardizacijo eksperimentalnega modela, kar je bilo potrebno zaradi visoke stopnje individualne variabilnosti v bioloških odzivih. Pri vseh živalih, od katerih so bili pridobljeni eksperimentalni podatki, so bili parametri dihanja, pretoka krvi in pretoka žolča konstantni in v normalnih mejah.

sperimentali, i parametri di frequenza respiratoria, flusso ematico e flusso biliare erano costanti e nella norma. Tutti i dati analitici e relativi protocolli sono archiviati nel server del Dipartimento di Scienze della vita, cartella Nutrizione.	Vsi analitični podatki in povezani protokoli so arhivirani na strežniku Oddelka za bioznanosti, v mapi Prehrana.
3. Effetto degli antociani sul trasporto intestinale della bilirubina	***3. Vpliv antocianinov na transport bilirubina v črevesju***
Questa prova pilota è stata eseguita in un modello in vitro di epitelio intestinale, che consente di simulare l'assorbimento intestinale di molecole d'interesse nutrizionale (come gli antociani) e farmaci. Il modello è ben conosciuto ed esprime diversi trasportatori di membrana della bilirubina glucuronide e dei sali biliari, tra cui sono di nostro interesse OATP1A2 e OATP2B1 (15) Abbiamo verificato che le condizioni sperimentali scelte consentono di misurare il trasporto di bilirubina e bilirubina glucuronide in modo riproducibile. Per ottenere misure affidabili, è necessario che il processo di trasporto trans-epiteliale duri almeno due ore. Abbiamo usato sia bilirubina pura che bile di ratto, che contiene anche bilirubina e bilirubina glucuronide e che abbiamo usato perché la bilirubina glucuronide pura non è disponibile in commercio. Lo schema dell'esperimento è in **Figura 7**.	Ta pilotni test je bil izveden na in vitro modelu črevesnega epitelija, ki nam omogoča simulacijo črevesne absorpcije prehransko pomembnih molekul (kot so antocianini) in zdravil. Model je dobro znan in izraža več membranskih prenašalcev bilirubin glukuronida in žolčnih soli, med katerimi sta za nas zanimiva OATP1A2 in OATP2B1 (15). Preverili smo, da nam izbrani eksperimentalni pogoji omogočajo reproducibilno merjenje transporta bilirubina in bilirubin glukuronida. Za zanesljive meritve mora proces transepitelnega transporta trajati vsaj dve uri. Uporabili smo tako čisti bilirubin kot podganji žolč, ki prav tako vsebuje bilirubin in bilirubin glukuronid in ki smo ga uporabili, ker čisti bilirubin glukuronid ni komercialno dostopen. Eksperimentalna shema je na **sliki 7**.



Figura 7. *Schema dell'esperimento di misura del trasporto trans-epiteliale di bilirubina. I dispositivi TRANSWELL sono stati riempiti con 0.5 mL di una soluzione contente o bile o bilirubina, in assenza o presenza dell'inibitore estradiolo 17-beta glucuronide. Questa soluzione era nel compartimento superiore, detto apicale, che riproduce le condizioni presenti nell'intestino. Il compartimento basale, che riproduce le condizioni presenti nel sangue, è quello da cui si sono prelevati dei campioni, per misurare il passaggio di bilirubina e bilirubina glucuronide attraverso lo strato di cellule intestinali Caco-2, cresciute sul filtro che separa il compartimento apicale da quello basale.*

Slika 7. *Shema poskusa merjenja transepitelnega transporta bilirubina. Naprave TRANSWELL so bile napolnjene z 0,5 ml raztopine, ki je vsebovala žolč ali bilirubin, v odsotnosti ali prisotnosti zaviralca estradiola 17-beta glukuronida. Ta raztopina je bila v zgornjem ali apikalnem predelu, ki posnema pogoje*

v črevesju. Bazalni predel, ki posnema pogoje v krvi, je kraj, kjer so bili odvzeti vzorci za merjenje prehoda bilirubina in bilirubin glukuronida skozi plast črevesnih celic Caco-2, vzgojenih na filtru, ki ločuje apikalni od bazalnega predela.

Abbiamo verificato che il trasporto trans-cellulare di entrambe le molecole, bilirubina e bilirubina glucuronide, è inibito dall'estradiolo 17-beta glucuronide, un noto inibitore di Oatp1A2-SLCO1A2 (16) un trasportatore che facilita l'entrata nell'epitelio intestinale di diverse molecole, tra cui la bilirubina (**Figura 8**).	Potrdili smo, da estradiol 17-beta glukuronid, znani zaviralec Oatp1A2-SLCO1A2 (16), prenašalca, ki olajša vstop več molekul, vključno z bilirubinom, v črevesni epitelij (**slika 8**), zavira transcelični transport obeh molekul, tako bilirubina kot bilirubin glukuronida.

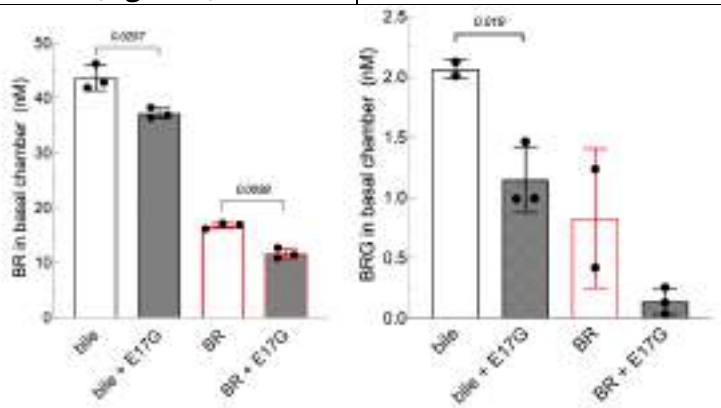


Figura 8. *Concentrazioni di bilirubina e bilirubina glucuronide nei compartimenti basali, ottenute due dopo l'applicazione di bile o bilirubina glucuronide, in assenza o presenza dell'inibitore estradiolo 17-beta glucuronide. In tutti i casi, l'inibitore ha ridotto il passaggio di bilirubina e bilirubina glucuronide dal compartimento apicale a quello basale. La riduzione è significativa statisticamente, solo quando i livelli di bilirubina glucuronide erano maggiori di 1 nM, il limite analitico di quantificazione.*

Slika 8*. Koncentracije bilirubina in bilirubin glukuronida v bazalnih predelih, pridobljene dvakrat po aplikaciji žolča ali bilirubin glukuronida, v odsotnosti ali prisotnosti inhibitorja estradiol 17-beta glukuronida. V vseh primerih je inhibitor zmanjšal premikanje bilirubina in bilirubin glukuronida iz apikalnega v bazalni predel. Zmanjšanje je bilo statistično značilno le, ko so bile ravni bilirubin glukuronida večje od 1 nM, kar je analitična meja kvantifikacije.*

È notevole il fatto che anche quando le prove di trasporto erano fatte con la bilirubina pura, nei campioni analizzati compariva la bilirubina glucuronide. La **Figura 9** mostra che nel compartimento basale compariva non solo la bilirubina alla concentrazione media di 15 nM, ma anche bilirubina glucuronide, alla concentrazione media di 0.8 nM.	Omeniti velja, da je bil bilirubin glukuronid prisoten v analiziranih vzorcih, tudi ko so bili transportni testi opravljeni s čistim bilirubinom. **Slika 9** kaže, da je bil v bazalnem predelu prisoten ne le bilirubin s povprečno koncentracijo 15 nM, temveč tudi bilirubin glukuronid s povprečno koncentracijo 0,8 nM.

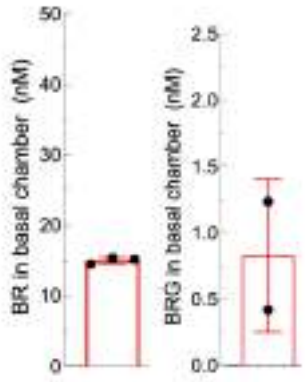


Figura 9. *Questa figura mette in evidenza i dati della Figura 6 ottenuti quando la bilirubina pura era applicata nel compartimento apicale.*
Slika 9*. Ta slika prikazuje podatke s slike 6, pridobljene z nanosom čistega bilirubina na apikalni predel.*

Questa è una prova che la bilirubina era penetrata nelle cellule, dove era avvenuta la reazione di formazione della bilirubina glucuronide, a sua volta esportata nel compartimento "ricevente". È noto che l'epitelio intestinale è sede di metabolismo (di fase 2, in termini tecnici) delle molecole assorbite, incluse le sostanze naturali della dieta e gli antociani (16)

Questo riscontro ha determinato la scelta successiva di eseguire tutte le prove di trasporto trans-epiteliare con la bilirubina pura e non con la bile. In due esperimenti consecutivi identici, abbiamo esaminato l'effetto sul trasporto trans-epiteliale della bilirubina di tre antociani puri (cianidina 3-glucoside, peonidina 3-glucoside e malvidina 3-glucoside) come indicato nella **Figura 10**.

To je dokaz, da je bilirubin prodrl v celice, kjer je prišlo do reakcije in tvorbe bilirubin glukuronida, ki se je nato prenesel v "sprejemni" predel. Znano je, da je črevesni epitelij mesto 2. faze presnove absorbiranih molekul, vključno z naravnimi prehranskimi snovmi in antocianini (16).

Ta ugotovitev je privedla do nadaljnje odločitve, da se vsi transepitelijski transportni testi izvedejo s čistim bilirubinom in ne z žolčem. V dveh enakih zaporednih poskusih smo preučili vpliv treh čistih antocianinov (cianidin 3-glukozida, peonidin 3-glukozida in malvidin 3-glukozida) na transepitelijski transport bilirubina, kot je prikazano na **sliki 10**.

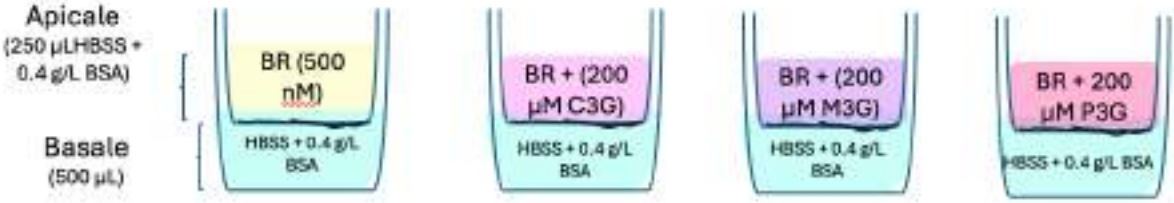
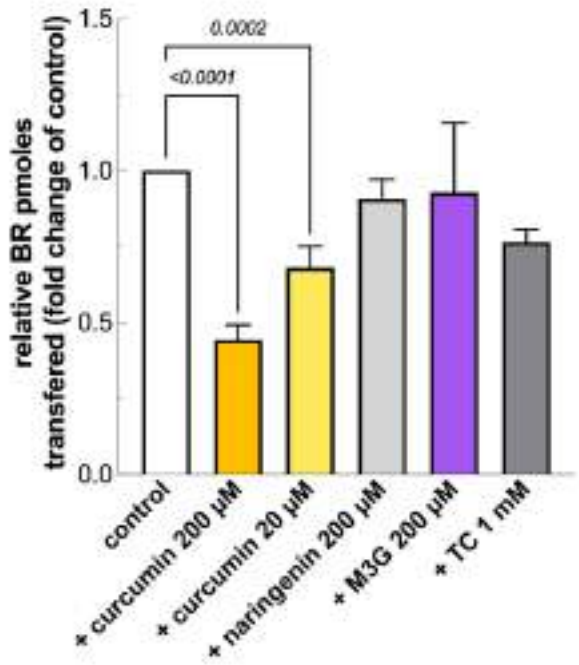
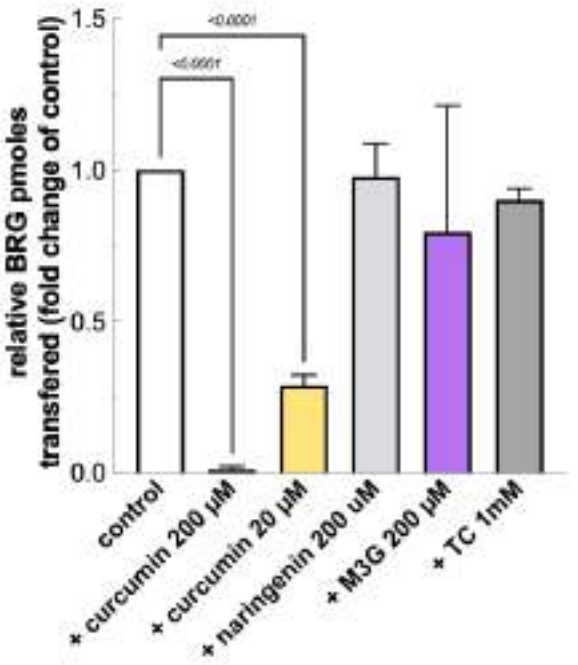


Figura 10. *Schema delle prove di trasporto trans-epiteliale della bilirubina in presenza di concentrazioni fisiologiche di cianidina 3-glucoside, malvidina 3-glucoside e peonidina 3-glucoside.*
Slika 10. *Shema testov transepitelnega transporta bilirubina v prisotnosti fizioloških koncentracij cianidin 3-glukozida, malvidin 3-glukozida in peonidin 3-glukozida.*

I risultati indicano che cianidina 3-glucoside e in minor misura malvidina 3-glucoside esercitavano un effetto di stimolazione (33% e 14%, rispettivamente) del trasporto della bilirubina (**Figura 10**). Quando, in questo modello sperimentale, si osserva una stimolazione del trasporto trans-cellulare di una data molecola (in questo caso bilirubina), si deve prendere in considerazione l'ipotesi che le molecole attivatrici abbiamo ridotto l'entrata netta della bilirubina nell'epitelio, attraverso l'inibizione delle pompe di estrusione molecolari, che proteggono l'epitelio dal sovraccarico di molecole presenti nell'intestino. Queste pompe (tecnicamente Pgp-ABCB1 e BCRP-ABCG2) sono dei trasportatori di membrana localizzati sulla superficie apicale delle cellule intestinali (Caco-2) e possono essere inibite da specifiche molecole, tra cui la curcumina. Abbiamo perciò ripetuto le prove di trasporto della bilirubina, in presenza di 2 diverse concentrazioni di curcumina, oppure di malvidina 3-glucoside, scelta perché è l'antociano più abbondante nel vino rosso, sebbene il suo effetto stimolante fosse limitato (vedi sopra, Figura 8). Inoltre, abbiamo incluso nella batteria di prove anche la naringenina e il taurocolato, noti inibitori dei trasportatori OATP1A2 e OATP2B1 (16), che potrebbero contribuire congiuntamente al trasporto trans-cellulare di bilirubina. Si deve considerare che anche la curcumina può essere un inibitore di OATP2B1, presente nell'epitelio intestinale (17). Lo schema dell'esperimento è in **Figura 11**.	Rezultati kažejo, da sta cianidin 3-glukozid in v manjši meri malvidin 3-glukozid imela stimulativni učinek (33 % oziroma 14 %) na transport bilirubina (**slika 10**). Ko v tem eksperimentalnem modelu opazimo stimulacijo transceličnega transporta dane molekule (v tem primeru bilirubina), je treba upoštevati hipotezo, da so aktivacijske molekule zmanjšale neto vstop bilirubina v epitelij z zaviranjem molekularnih ekstruzijskih črpalk, ki ščitijo epitelij pred preobremenitvijo molekul, prisotnih v črevesju. Te črpalke (tehnično Pgp-ABCB1 in BCRP-ABCG2) so membranski prenašalci, lokalizirani na apikalni površini črevesnih celic (Caco-2) in jih lahko zavirajo specifične molekule, vključno s kurkuminom. Zato smo teste transporta bilirubina ponovili v prisotnosti dveh različnih koncentracij kurkumina oziroma malvidin 3-glukozida, izbranega zato, ker je najpogostejši antocianin v rdečem vinu, čeprav je bil njegov stimulativni učinek omejen (glej zgoraj, sliko 8). Poleg tega smo v baterijo testov vključili tudi naringenin in tauroholat, znana zaviralca transporterjev OATP1A2 in OATP2B1 (16), ki bi lahko skupaj prispevala k transceličnemu transportu bilirubina. Upoštevati je treba, da je kurkumin lahko tudi zaviralec OATP2B1, prisotnega v črevesnem epiteliju (17). Shema poskusa je na **sliki 11**.



Figura 11. *Schema delle prove di trasporto trans-epiteliale della bilirubina in presenza di concentrazioni farmacologiche di curcumina, naringina, malvidina 3-glucoside e taurocolato.*
Slika 11. *Shema testov transepitelnega transporta bilirubina v prisotnosti farmakoloških koncentracij kurkumina, naringina, malvidin 3-glukozida in tauroholata.*

I risultati (**Figura 12**) indicano che solo la curcumina inibisce il trasporto della bilirubina, mentre la naringenina, inibitore di OATP2B1 (16) e il taurocolato, inibitore di OATP1A2 (18) sono inattivi. Anche la malvidina 3-glucoside non ha confermato l'effetto di stimolazione del trasporto trans-cellulare di bilirubina. Si noti che la curcumina ha anche ridotto il trasporto trans-cellulare della bilirubina glucuronide. Questo dato è compatibile con l'effetto combinato di minor entrata della bilirubina nell'epitelio intestinale e ridotta reazione di coniugazione della bilirubina con l'acido glucuronico. Quest'ultima reazione è catalizzata dall'enzima UGT1A1, inibito dalla curcumina (17).	Rezultati (**slika 12**) kažejo, da samo kurkumin zavira transport bilirubina, medtem ko sta naringenin, znani zaviralec OATP2B1 (16), in tauroholat, znani zaviralec OATP1A2 (18), neaktivna. Malvidin 3-glukozid prav tako ni potrdil učinka spodbujanja transceličnega transporta bilirubina. Upoštevajte, da je kurkumin zmanjšal tudi transcelularni transport bilirubin glukuronida. Ta ugotovitev je združljiva s kombiniranim učinkom zmanjšanega vstopa bilirubina v črevesni epitelij in zmanjšane reakcije konjugacije bilirubina z glukuronsko kislino. Slednjo reakcijo katalizira encim UGT1A1, ki ga zavira kurkumin (17).
	
Figura 10. Trasporto trans-cellulare della bilirubina ed effetti di curcumina, naringenina, malvidina 3-glucoside (M3G) e taurocolato (TC).	**Slika 10.** Transcelularni transport bilirubina in učinki kurkumina, naringenina, malvidin 3-glukozida (M3G) in tauroholata (TC).
In conclusione, questa prima serie di dati indica che il modello sperimentale di intestino umano in vitro dato dalle cellule Caco-2 disposte uniformemente sul dispositivo Transwell consente di misurare il **trasporto trans-epiteliale della bilirubina e di caratterizzarlo come mediato dal trasportatore OATP2B1, poiché sensibile all'inibizione esercitata da**	Skratka, ta prvi sklop podatkov kaže, da nam in vitro model človeškega črevesja z uporabo celic Caco-2, enakomerno razporejenih na napravi Transwell, omogoča merjenje **transepitelnega transporta bilirubina in njegovo karakterizacijo kot posredovanega s transporterjem OATP2B1, saj je občutljiv na inhibicijo z estradiol 17-beta glukuronidom**

estradiolo 17-beta glucuronide (vedi sopra, Figura 6) e curcumina (vedi sopra, Figura 10). Tuttavia, **la malvidina 3-glucoside non ha alcun effetto sul trasporto della bilirubina**. Altre prove potranno essere fatte riprodurre queste osservazioni e migliorare la qualità complessiva della base di dati. Tutti i dati analitici e relativi protocolli sono archiviati nel server del Dipartimento di Scienze della vita, cartella Nutrizione.	(glej zgoraj, sliko 6) in kurkuminom (glej zgoraj, sliko 10). Vendar **malvidin 3-glukozid nima vpliva na transport bilirubina.** Za reprodukcijo teh opažanj in izboljšanje splošne kakovosti baze podatkov se lahko izvedejo nadaljnji poskusi. Vsi analitični podatki in povezani protokoli so arhivirani na strežniku Oddelka za znanosti o življenju, mapa Prehrana.

CONCLUSIONI	ZAKLJUČKI
Questo STUDIO PILOTA ha generato una grande mole di dati sperimentali da tre diverse linee di studio. La linea della farmacocinetica della bilirubina nel ratto e l'effetto della cianidina 3-glucoside è quella iniziata prima ed i suoi dati sono stati analizzati più a fondo. Il prodotto è una tesi di laurea magistrale in farmacia redatta dalla studentessa Alexandra Cristina Duhnic. Alla fine del progetto sono stati ripetuti alcuni esperimenti. Si prevede di scrivere un articolo scientifico. La linea dell'effetto della cianidina 3-glucoside sul riassorbimento biliare della bilirubina, esaminata nel ratto in vivo, è stata chiusa ma l'analisi dei dati sarà completata dopo la fine del progetto. La linea del trasporto intestinale di cianidina 3-glucoside e bilirubina esaminata in colture cellulari è ancora aperta, poiché sono necessarie alcune ripetizioni delle prove e verifiche. La lenta crescita delle cellule intestinali sui filtri Transwell condiziona il progresso della sperimentazione. In conclusione, la comprensione dei dati ottenuti con questo studio pilota si svilupperà dopo la conclusione di questo progetto e, in questo modo, il tema scientifico e la collaborazione con il Lead partner resteranno attivi nei prossimi anni.	Ta PILOTNA ŠTUDIJA je ustvarila veliko količino eksperimentalnih podatkov iz treh različnih študijskih linij. Prva se je začela študijska linija o farmakokinetiki bilirubina pri podganah in učinku cianidin 3-glukozida, njeni podatki pa so bili zelo temeljito analizirani. Izdelek je magistrska naloga iz farmacije, ki jo je napisala študentka Alexandra Cristina Duhnic. Ob koncu projekta so bili nekateri poskusi ponovljeni. Načrtuje se znanstveni članek. Študijska linija o učinku cianidin 3-glukozida na žolčno reabsorpcijo bilirubina, ki je bila in vivo preučena pri podganah, je bila zaključena, vendar bo analiza podatkov zaključena po koncu projekta. Študija o črevesnem transportu cianidin 3-glukozida in bilirubina, ki je bila preučena v celičnih kulturah, je še vedno odprta, saj so potrebne nekatere ponovitve testov in preverjanj. Počasna rast črevesnih celic na filtrih Transwell vpliva na napredek preskušanja. Skratka, razumevanje podatkov, pridobljenih s to pilotno študijo, se bo nadaljevalo tudi po zaključku projekta, zato se bo znanstvena tema in sodelovanje z vodilnim partnerjem nadaljevalo še vrsto let.
Riferimenti bibliografici	**Bibliografske reference**

1. Pelizzo P, Stebel M, Medic N, Sist P, Vanzo A, Anesi A, et al. Cyanidin 3-glucoside targets a hepatic bilirubin transporter in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023;157:114044.
2. Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. Bilirubin and beyond: A review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. Prog Lipid Res. 2013;52(2):193–205.
3. Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. Biochem Biophys Res Commun. 2002;296(3):631–6.

4. Passamonti S, Vanzo a., Vrhovsek U, Terdoslavich M, Cocolo a., Decorti G, et al. Hepatic uptake of grape anthocyanins and the role of bilitranslocase. Food Research International. 2005;38(8–9):953–60.
5. Vanzo A, Vrhovsek U, Tramer F, Mattivi F, Passamonti S. Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. J Nat Prod. 2011 May;74(5):1049–54.
6. Vanzo A, Scholz M, Gasperotti M, Tramer F, Passamonti S, Vrhovsek U, et al. Metabonomic investigation of rat tissues following intravenous administration of cyanidin 3-glucoside at a physiologically relevant dose. Metabolomics. 2013;9(1):88–100.
7. Fornasaro S, Ziberna L, Gasperotti M, Tramer F, Vrhovsek U, Mattivi F, et al. Determination of cyanidin 3-glucoside in rat brain, liver and kidneys by UPLC/MS-MS and its application to a short-term pharmacokinetic study. Sci Rep. 2016;6:22815.
8. Vitek L, Hinds TD, Stec DE, Tiribelli C. The physiology of bilirubin: health and disease equilibrium. Trends Mol Med [Internet]. 2023;29(4):315–28. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147149142300031X
9. Wilken MR, Lambert MNT, Christensen CB, Jeppesen PB. Effects of Anthocyanin-rich Berries on the Risk of Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. Review of Diabetic Studies. 2022 Mar 9;18(1):42–57.
10. Sist P, Tramer F, Bandiera A, Urbani R, Redenšek Trampuž S, Dolžan V, et al. Nanoscale Bilirubin Analysis in Translational Research and Precision Medicine by the Recombinant Protein HUG. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. 2023. p. 16289.
11. Sist P, Bandiera A, Urbani R, Passamonti S. Macromolecular and Solution Properties of the Recombinant Fusion Protein HUG. Biomacromolecules. 2022 Jul 25;23(8):3336–48.
12. Sist P, Saeed S, Tramer F, Bandiera A, Passamonti S. Standardized lab-scale production of the recombinant fusion protein HUG for the nanoscale analysis of bilirubin. MethodsX [Internet]. 2024 Dec;13:103001. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215016124004527
13. Sist P, Tramer F, Urbani R, Bandiera A, Passamonti S. Preparation and validation of nanomolar aqueous bilirubin standard solutions. MethodsX [Internet]. 2025 Jun;14:103123. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215016124005740
14. Ke Z, Liu Y, Wang X, Fan Z, Chen G, Xu M, et al. Cyanidin-3-glucoside ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing brain. J Neurosci Res. 2011 Oct;89(10):1676–84.
15. Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52:135–51.
16. Stieger B, Mahdi ZM, Jager W. Intestinal and Hepatocellular Transporters: Therapeutic Effects and Drug Interactions of Herbal Supplements. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2017 Jan;57:399–416.
17. Jaerapong N, Jamil Q, Riha J, Milovanovic D, Krupitza G, Stieger B, et al. Organic anion-transporting polypeptides contribute to the uptake of curcumin and its main metabolites by human breast cancer cells: Impact on antitumor activity. Oncol Rep. 2019 Feb 14;