

## METABOLIZAM POLIAMINA U MOŽDANOM TKIVU PACOVA SA EKSTRAHEPATICNOM HOLESTAZOM

Dušan Sokolović<sup>1</sup>, Gordana Bjelaković<sup>1</sup>, Jelenka Nikolić<sup>1</sup>, Gordana Kocić<sup>1</sup>, Boris Đindić<sup>2</sup>, Dušica Pavlović<sup>1</sup>, Ivana Stojanović<sup>1</sup>, Tatjana Cvetković<sup>1</sup>, Tatjana Jevtović-Stoimenov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu

<sup>2</sup>Katedra za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu

**Kratak sadržaj:** Patogeneza encefalopatije u holestazi je proizvod akumulacije nekonjugovanog bilirubina i hidrofobnih žučnih kiselina u moždanom tkivu. Putrescin, spermidin i spermin su endogeni poliamini neophodni za rast, proliferaciju i regeneraciju ćelija. L-metionin je aminokiselina neophodna za biosintezu poliamina. Cilj ove studije bio je proučavanje efekta L-metionina na metabolizam poliamina u mozgu pacova sa holestazom. Wister pacovi bili su podeljeni u 3 grupe: I-kontrola, II-pacovi sa podvezanim ductusom choledochusom, III-pacovi sa holestazom tretirani L-metioninom (50 mg/kg TM). Životinje su nakon 9 dana eksperimenta žrtvovane. U mozgu pacova sa holestazom javlja se povećanje nivoa putrescina ( $p < 0,001$ ), i smanjenje koncentracije spermidina i spermina ( $p < 0,05$ ), u odnosu na kontrolu. Aktivnost PAO je povećana ( $p < 0,001$ ), dok je aktivnost DAO smanjena ( $p < 0,001$ ) u mozgu pacova sa holestazom, u odnosu na kontrolu. Davanje L-metionina životinjama sa holestazom sprečava poremećaj biosinteze i katabolizma poliamina u moždanom tkivu.

**Cljučne reči:** poliamini, holestaza, L-metionin, mozak

### Uvod

U uslovima holestaze, usled poremećaja toka žuči, dolazi do hepatocelularnog zadržavanja bilijarnih sastojaka, a u sledu događaja i do oštećenja hepatocita i encefalopatije (delovanjem nakupljenih hidrofobnih žučnih kiselina i nekonjugovanog bilirubina) (1). Usled deterđentnog dejstva toksičnih žučnih kiselina, narušava se permeabilnost ćelijske membrane (2). Dokazana je pojava oksidativnog stresa u moždanom tkivu i jetri u uslovima holestaze (3, 4).

Poliamini (spermin, spermidin i putrescin) predstavljaju neproteinske azotne baze male molekulske mase prisutne u svim živim sistemima. Oni su rasprostranjeni u skoro svim tkivima i organima životinja i čoveka i zato može da se kaže da su oni neophodni za život (5, 6). Na ogromnu važnost poliamina ukazu-

je njihova nezamenjiva uloga u vitalnim procesima rasta, deobe i diferencijacije ćelija, kao i njihova regulacija permeabilnosti i stabilnosti ćelijske membrane (7). Dokazano je da poliamini inhibiraju proces lipidne peroksidacije i sprečavaju proces apoptoze (8).

Poliamini se nalaze u velikim količinama u nervnom tkivu. Nivo spermidina je najveći u beloj masi, dok je koncentracija putrescina najveća u kori velikog mozga, hipotalamusu, cerebelumu i kičmenoj moždini (9). Sadržaj poliamina u likvoru je zanemarljiv.

Glavni put biosinteze poliamina u mozgu se ne razlikuje od onog u perifernim tkivima. Spermidin se sintetise iz putrescina (nastalog iz ornitina pomoću ornitin dekarboksilaze, ODC) i dekarboksilanog S-adenozilmetionina (dcSAM), dok spermin nastaje iz spermidina i dcSAM-a.

Dokazano je da su ćelije mozga izuzetno osetljive na smanjenje nivoa poliamina, i one su sposobne da prepoznaju sniženje njihove koncentracije i da pokrenu regulatorne mehanizme, čiji je krajnji cilj održavanje normalnog nivoa ovih jedinjenja (10).

Proces razgradnje poliamina u mozgu je vrlo spor. U tkivu mozga opisana su dva katabolička puta poliamina. Prvi je ekvivalentan putu interkonverzije/

#### Adresa autora:

Ass. Dušan Sokolović  
Institut za biohemiju  
Medicinski fakultet u Nišu  
Bul. dr Zorana Đindića 81  
18000 Niš  
tel: 018/226-644 lok. 131  
e-mail: soko@medfak.ni.ac.yu

biodegradacije poliamina u perifernim tkivima (acetilazno/oksidazni put), koji se odvija uz katalitičko dejstvo spermidin/spermin N<sup>1</sup>-acetiltransferaze (SSAT), poliamin oksidaze (PAO) i diamin oksidaze (DAO), dok se drugi odvija preko  $\gamma$ -amino-butiraldehida kao intermedijera, do CO<sub>2</sub> koji je krajnji produkt (11).

Dokazano je da poliamini imaju ulogu u moduliranju ili čak posredovanju u centralnoj sinaptičkoj transmisiji u tkivu mozga. U koncentracijama od nekoliko mikrograma spermidin dovodi do sedacije i hipotermije kod miševa, dok veće koncentracije spermina izazivaju konvulzije (12).

L-metionin je esencijalna tio-aminokiselina. Svoju ulogu L-metionin ostvaruje u svom aktivnom obliku (S-adenozilmetionin, SAM). Za sintezu poliamina potreban je dekarboksilisani SAM.

Metionin, kao glavni donator metil grupe, učestvuje u mnogim transmetilacionim reakcijama. Značajan je za sintezu nukleinskih kiselina i proteina, a učestvuje i u metilaciji fosfolipida i time povećava stabilnost membranskih struktura (13). Svojim tiol grupama učestvuje u transsulfuracionim reakcijama. On služi za sintezu cisteina, a preko njega i u sintezi tripeptida glutationa (GSH), glavnog prirodnog endogenog hepatoprotekturnog agensa.

Cilj ovog istraživanja bio je da se u uslovima ekstrahepatičneolestaze kod pacova ustanovi: nivo poliamina (spermina, spermidina i putrescina), aktivnost PAO i DAO, kao i efekat L-metionina na metabolizam poliamina u moždanom tkivu.

## Materijal i metode

### Materijal

Eksperiment je izveden na belim pacovima Wister soja, muškog pola, starosti 5 meseci, težine od 250 do 300 grama. Eksperimentalnaolestaza izazvana je postupkom podvezivanja ductus choledochusa, hirurškim koncem, u Ketamin anesteziji (aplikovan je intraperitonealno u dozi od 2 mL/kg TM), uz mere dezinfekcije i sterilizacije.

Eksperimentalne životinje su bile podeljene u 3 eksperimentalne grupe:

I grupa-kontrola (lažno operisane životinje) – životinjama je, u Ketamin anesteziji, bila otvarana i zatvarana abdominalna duplja, bez izvođenja operacije podvezivanja ductusa choledochusa, da bi se eliminisali efekti same operacije na ispitivane parametre. Svakodnevno je bio aplikovan fiziološki rastvor (i.p.).

II grupa (olestaza) – U prva 2 dana eksperimenta, pacovima je aplikovan fiziološki rastvor (i.p.), a zatim je izvršena operacija (podvezivanja ductusa choledochusa) uz nastavak davanja 154 mmol/L rastvora NaCl naredna 7 dana, svakodnevno.

III grupa (olestaza+L-metionin) – Prva 2 dana

eksperimenta životinjama je oralno aplikovan L-metionin (»Sigma«), u dozi od 50 mg/kg TM, a zatim je izvršeno podvezivanje ductusa choledochusa uz nastavak aplikacije iste aminokiseline, narednih 7 dana.

Životinje su žrtvovane nakon 9 dana eksperimenta u Ketamin anesteziji, posle gladovanja od 15 sati. Krv je uzimana punkcijom iz aorte abdominalis, nakon medijalne laparatomije. Heparinizirana krv je centrifugirana na 3 000 ob/min, a izdvojena plazma je do analiza čuvana na –20 °C. Za biohemijska ispitivanja uziman je mozak, koji je višestruko ispiran u hladnom izotoničnom rastvoru NaCl, odmah zamrzavan na –20 °C i tako čuvan do homogenizovanja. Zatim je pripreman 25%-tni homogenat mozga u destilovanoj vodi na 0 °C. Homogenizovanje tkiva je vršeno Poterovim homogenizatorom sa teflonskim tučkom.

### Biohemijski parametri

*$\gamma$ -glutamyltransferaza ( $\gamma$ -GT).* Aktivnost enzima  $\gamma$ -GT u plazmi određivana je gotovim testom firme Ellitech, na aparatu BTS-370 (BioSystems) (14).

*Alkalna fosfataza (AF).* Aktivnost enzima AF u plazmi, određivana je gotovim testom firme Ellitech, na aparatu BTS-370 (BioSystems) (15).

*Alanin aminotransferaza (ALT).* Aktivnost enzima ALT u plazmi određivana je gotovim testom firme Ellitech, na aparatu BTS-370 (BioSystems) (16).

*Poliamini.* Poliamini (spermin, spermidin i putrescin) određivani su elektroforetskom tehnikom na Whitmanovom papiru N° 3 pri 8 V/cm<sup>2</sup> u trajanju od 60 minuta. Metoda je zasnovana na ekstrakciji poliamina iz tkiva mozga u alkalnoj sredini pomoću n-butanola i kolorimetrijskom merenju nakon separacije poliamina tehnikom elektroforeze i bojenjem ninhidriinom (17, 18).

*Poliamin oksidaza (PAO) i diamin oksidaza (DAO).* Aktivnost PAO i DAO u mozgu određivana je spektrofotometrijskom metodom po Buchrachu i Rechesu, na bazi merenja količine stvorenog aminoaldehida (19).

*Proteini.* Količina ukupnih proteina u moždanom tkivu određivana je metodom po Lowryu (20).

### Statističke metode

Rezultati su obrađeni korišćenjem Studentovog t-testa, a sve merne veličine su izražavane kao srednja vrednost  $\pm$  SD. Obrada dobijenih podataka izvršena je korišćenjem statističkog programskog paketa – »Statistical Package for Social Science« (SPSS) softverom, verzija 11,0 u Windows 2000 okruženju, pri čemu su rezultati prikazani tabelarno i grafički.

### Rezultati

U cilju procene efekta podvezivanja ductusa choledochusa, određivana je aktivnost enzima markera holestaznog oštećenja, dok je količina putrescina značajno (skoro dvostruko) povećana u odnosu na lažno operisane životinje ( $110 \pm 13,2$  vs.  $65 \pm 6,8$  nmol/g tkiva;  $p < 0,001$ ) (Slika 1).

Aktivnost PAO u tkivu mozga holestaznih pacova je značajno veća u odnosu na lažno operisane životinje ( $1,25 \pm 0,09$  vs.  $0,81 \pm 0,08$  U/mg prot;  $p < 0,001$ ). Aktivnost DAO u istom tkivu pokazala je suprotan trend, i vrednosti kod holestaznih pacova bile su značajno niže u odnosu na lažno operisane životinje ( $0,33 \pm 0,06$  vs.  $0,68 \pm 0,10$  U/mg prot;  $p < 0,001$ ) (Slika 2).

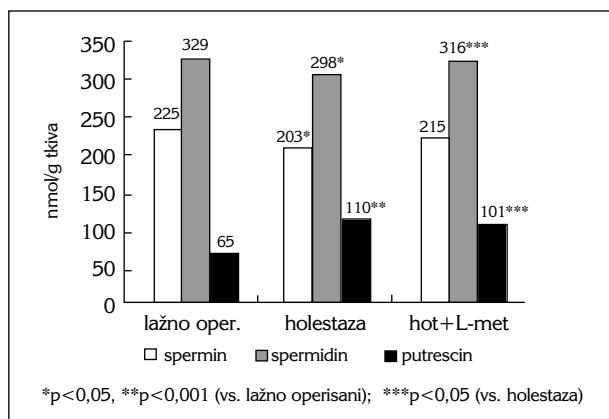
Aplikovanje L-metionina pacovima sa podvezanim ductusom choledochusom dovodi do pada nivoa putrescina ( $101 \pm 7,8$  vs.  $110 \pm 13,2$  nmol/g tkiva;  $p < 0,05$ ), kao i porasta količine spermidina ( $326 \pm 18,2$  vs.  $298 \pm 19,2$  nmol/g tkiva;  $p < 0,05$ ) u tkivu mozga pacova u odnosu na životinje sa holestazom kojima nije aplikovan L-metionin (Slika 1).

U grupi pacova s holestazom kojima je oralno davan L-metionin zapaženo je statistički značajno sniženje aktivnosti PAO ( $1,01 \pm 0,05$  vs.  $1,25 \pm 0,09$  U/mg prot;  $p < 0,001$ ), kao i povišenje aktivnosti DAO ( $0,42 \pm 0,11$  vs.  $0,33 \pm 0,06$  U/mg prot;  $p < 0,001$ ), u tkivu mozga u odnosu na holestazne pacove kojima nije davana pomenuta aminokiselina (Slika 2).

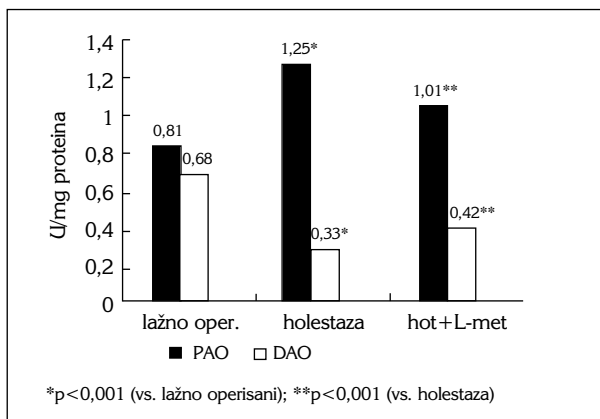
Tabela I Aktivnost enzima markera holestaznog oštećenja u krvnoj plazmi pacova

| Aktivnost enzima (U/L) | Kontrola (lažno operisani) | Holestaza          | Holestaza + L-metionin |
|------------------------|----------------------------|--------------------|------------------------|
| GGT                    | $5,3 \pm 0,2$              | $19,9 \pm 3,4^*$   | $12,9 \pm 1,2^{**}$    |
| AF                     | $194,2 \pm 12,0$           | $340,5 \pm 45,1^*$ | $176,8 \pm 34,4^{**}$  |
| ALT                    | $45,0 \pm 12,3$            | $101,5 \pm 14,2^*$ | $63,5 \pm 14,8^{**}$   |

\* $p < 0,001$  (vs. lažno operisani); \*\* $p < 0,001$  (vs. holestaza)



Slika 1 Nivo poliamina (spermina, spermidina i putrescina) u moždanom tkivu eksperimentalnih životinja.



Slika 2 Aktivnost PAO i DAO u moždanom tkivu pacova

### Diskusija

Postoje oprečni stavovi o efektima poliamina u moždanom tkivu. Mogući neuroprotektivni efekti poliamina se pripisuju: 1) antiapoptičkim i antioksidativnim efektima, 2) promeni neuronalne ekscitabilnosti, 3) stabilizaciji hromatina (21). Eventualni mehanizmi neuronalnog oštećenja koji zavise od poliamina su: 1) aktivacija fluksa  $Ca^{2+}$  i oslobađanje neurotransmitera u oblastima sa povećanom produkcijom putrescina, 2) povećana stimulacija NMDA receptorskog kompleksa, izazvana oslobađanjem poliamina u ekstracelularni prostor, tokom i nakon oštećenja CNS-a, 3) spermin može da pokrene apoptozu ćelija mozga, stimulišući oslobađanje citohroma c iz mitohondrija i aktivirajući kaspazu 3 (22).

Cerebralni ODC/poliaminski sistem je veoma osetljiv na fiziološke i patološke stimuluse u moždanom tkivu (uključujući i oštećenje CNS-a u uslovima holestaze). Dokazano je da se posle oštećenja CNS-a javlja značajan porast aktivnosti ODC-a i akumulacija putrescina, ali ne i spermidina i spermina u mozgu (21). Utvrđeno je da su promene u metabolizmu poliamina povezane sa stepenom oštećenja CNS-a i imaju značajnu ulogu u degeneraciji neurona (23).

U mozgu holestaznih pacova u ovom eksperimentalnom modelu utvrđen je značajan porast nivoa putrescina. Postoje dva kontradiktorna gledišta o značaju visokih koncentracija putrescina u mozgu.

Prvo gledište podrazumeva da porast nivoa putrescina u mozgu (zbog povećane aktivnosti ODC) predstavlja glavni uzrok neuronalnog oštećenja. (Uloga putrescina u izazivanju neuronalne nekroze može se objasniti: 1) zavisnim odnosom između akumulacije putrescina i stepena nekroze, 2) aktivnošću putrescina u stimulaciji NMDA receptora i 3) da se u post-ishemijskoj neuronalnoj nekrozi stvara povećana količina putrescina (22).

Drugo gledište je suprotno i sastoji se u tome da povećanje sadržaja putrescina predstavlja najvažniju neuroprotektivnu meru CNS-a, pre nego uzrok ošte-

ćenja. U skladu sa ovim gledištima, istraživanja poslednjih godina su ukazala na to da dugotrajna povećana ekspresija ODC-a kod miševa nije dovela do degeneracije neurona, i da putrescin čak podstiče regeneraciju oštećenih aksona i neurona (21). Ovi rezultati su kontradiktorni sa ranijim istraživanjima, po kojima direktna infuzija putrescina u mozak stvara neuropatološke lezije, koje se ne mogu razlikovati od ishemičkih lezija. U najnovijim eksperimentima, intrakortikalne ili intrastrijatalne aplikacije mikro doza putrescina nisu bile neurotoksične, što može da nam sugerise da efekti egzogenih poliamina na mozak nisu toksični (21, 22).

U mozgu holestaznih pacova u ovom eksperimentu zapaženo je pored povećanja nivoa putrescina i blago smanjenje nivoa spermina i spermidina u odnosu na lažno operisane životinje. Može se pretpostaviti da nemogućnost povećanja nivoa spermidina/spermina kod ovih životinja pokazuje da putrescin, verovatno kroz sekvencije u vakuole ili putem nekog drugog nepoznatog mehanizma, postaje nedostupan za dalju konverziju u spermidin i spermin (22). Henley i sar. (24) su dokazali da nakon oštećenja CNS-a dolazi do smanjenog nivoa SAM-a i smanjenja aktivnosti enzima SAM-dekarboksilaze (koji obezbeđuje amino-propilne grupe neophodne za konverziju putrescina u spermidin i spermin). Studija Pashena (25) je dokazala da se smanjenje količine spermina i spermidina u uslovima moždanog oštećenja javlja zbog njihovog povećanog izlaska u krv iz teško oštećenih neurona. Zabeleženo je oslobađanje spermidina iz oštećenog moždanog tkiva u periferni krvotok, kod pacijenata sa fokalnom cerebralnom ishemijom (26).

Eksperimentalna istraživanja na pacovima su pokazala da dugotrajan tretman poliaminima može da zaštiti neurone nakon oštećenja CNS-a (22). Pokazano je da spermin ima antioksidativna svojstva koja se ogledaju u uklanjanju slobodnih radikala. Poznato je da spermin deluje kao jak antioksidans tako što ili eliminiše slobodne radikale kiseonika ili vrši »helaciju«  $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  (27). Pošto je u našem eksperimentalnom modelu, u tkivu mozga holestaznih pacova, došlo do smanjenja nivoa spermina i spermidina, može se pretpostaviti da je ukupni anti-oksidativni i anti-apoptotički kapacitet moždanog tkiva smanjen i time se verovatno toksično oštećenje mozga pojačava i produbljuje.

Aplikovanje L-metionina pacovima sa podvezanim ductusom choledochusom dovodi do blagog sniženja nivoa putrescina, laganog (statistički neznačajnog) porasta količine spermina i statistički značajnog porasta nivoa spermidina u tkivu mozga pacova u odnosu na životinje sa holestazom kojima nije aplikovan L-metionin. Dobijeni rezultati se mogu tumačiti tako da egzogeno aplikovanje L-metionina ho-

lestaznim pacovima najverovatnije dovodi do povećanja koncentracije ove aminokiseline u cirkulaciji i njenog posledičnog prodora u moždano tkivo (specifičnim transportnim proteinima). Povećanje nivoa L-metionina u mozgu holestaznih pacova (tj. njena aktivna forma – SAM) može uticati na povećanu biosintezu spermidina i spermina.

Značajan porast aktivnosti PAO u mozgu holestaznih pacova mogao bi se objasniti intenziviranjem procesa interkonverzije poliamina, u kome PAO katalizuje reakciju konverzije spermina u spermidin i spermidina u putrescin. Ovaj acetilazno/oksidazni put omogućava regulaciju nivoa poliamina i mogućnost njihove dispozicije (25). Za katabolizam spermina/spermidina u putrescin koji se odvija pomoću enzimskog sistema SSAT/PAO karakteristično je izdvajanje toksičnih 3-acetaminopropanala i  $H_2O_2$ . Citotoksičnost 3-aminopropanala je regulisana oticanjem u akrolein. Toksičan  $H_2O_2$  (reaktivna vrsta kiseonika – ROS) može da ošteti proteine, DNK i lipide, kao i da pokrene apoptozu. Mnoge studije sugerisu da je poliaminska toksičnost direktna posledica oslobađanja  $H_2O_2$  (njegovim katabolizmom) (25).

Promena aktivnosti DAO u serumu i tkivima životinja i čoveka udružene su sa brojnim patološkim stanjima. Zabeležen je pad aktivnosti DAO kod tumora mozga (29). U mozgu holestaznih pacova u ovoj studiji utvrđeno je da je aktivnost DAO statistički značajno snižena u odnosu na lažno operisane životinje. Ovi rezultati se mogu protumačiti tako da se sniženjem aktivnosti DAO u holestazno oštećenom moždanom tkivu smanjuje i nivo katabolizma putrescina, čime se povećava koncentracija ovog poliamina u mozgu. Povećanjem nivoa putrescina u moždanom tkivu intenziviraju se i njegovi neuroprotektivni efekti.

U eksperimentalnoj grupi pacova sa holestazom kojima je oralno davan L-metionin zapaženo je značajno sniženje aktivnosti PAO i povišenje aktivnosti DAO u tkivu mozga, u odnosu na holestazne pacove kojima nije davana ova aminokiselina. Porast aktivnosti DAO u tkivu mozga holestaznih pacova kojima je aplikovan L-metionin (u odnosu na pacove sa holestazom) najverovatnije doprinosi blagom smanjenju nivoa putrescina. Takođe, pad aktivnosti PAO u već pomenutoj eksperimentalnoj grupi životinja može uticati na smanjenje katabolizma spermina i spermidina u tkivu mozga (naši rezultati potvrđuju blagi porast nivoa spermina i spermidina u ovoj grupi pacova).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da oralno davanje L-metionina životinjama sa holestazom sprečava poremećaj biosinteze i katabolizma poliamina u moždanom tkivu. L-metionin se kao neuroprotektor može preporučiti u kliničkoj praksi za terapiju pacijenata sa holestazom.

## METABOLISM OF POLYAMINES IN RATS' BRAIN WITH EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS

*Dušan Sokolović<sup>1</sup>, Gordana Bjelaković<sup>1</sup>, Jelenka Nikolić<sup>1</sup>, Gordana Kocić<sup>1</sup>, Boris Đinđić<sup>2</sup>,  
Dušica Pavlović<sup>1</sup>, Ivana Stojanović<sup>1</sup>, Tatjana Cvetković<sup>1</sup>, Tatjana Jevtović-Stoimenov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine in Niš, Serbia and Montenegro*

<sup>2</sup>*Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine in Niš, Serbia and Montenegro*

*Summary:* The pathogenesis of encephalopathy in cholestasis results from the accumulation of unconjugated bilirubin and hydrophobic bile acids in the brain. Putrescine, spermidine and spermine are endogenous polyamines essential for cellular growth, proliferation and regeneration. The amino-acid L-methionine is required for the biosynthesis of polyamines. The aim of the study was to examine the effect of L-methionine in polyamine metabolism on the cholestatic brain of injured rats. Wistar rats were divided into 3 groups: I – control, II – bile duct ligated (BDL) rats, III – BDL rats treated with L-methionine (50 mg/kg BW). Cholestasis in rats' brain increases the putrescine level ( $p < 0.001$ ) and decreases spermidine and spermine concentrations ( $p < 0.05$ ), in relation to controls. The activity of PAO is increased ( $p < 0.001$ ) and activity of DAO is reduced ( $p < 0.001$ ) in the brain of BDL rats compared with controls. Administration of L-methionine in BDL rats prevents disorders of the biosynthesis and catabolism of polyamines in the brain during cholestasis.

*Key words:* polyamines, cholestasis, L-methionine, brain

### Literatura

1. Kullak-Ublick G, Maier P. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* 2000; 4 (2): 357–85.
2. Schmucker DL, Ohta M, Kanai S et al. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990; 12 (5): 1216–21.
3. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW et al. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001; 33 (3): 616–26.
4. Tsai LY, Lee KT, Liu TZ. Evidence for Accelerated Generation of Hydroxyl Radicals in Experimental Obstructive Jaundice of Rats. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; 24 (5): 732–37.
5. Tabor H, Tabor CW. Spermidine, spermine and related amines. *Pharmacol Rev* 1964; 16: 245–300.
6. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 244–58.
7. Schuber F. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J* 1989; 260: 1–10.
8. Tadolini B. Polyamine inhibition of lipid peroxidation. *Biochem J* 1988; 249: 830–33.
9. Shaw GG, Pateman AJ. The regional distribution of the polyamines spermine and spermidine in brain. *J Neurochem* 1973; 20: 1225–30.
10. Slotkin TA, Bartolome J, Persons D, Whitmore WL. Polyamines in brain and heart of the neonatal rat: effects of inhibitors of ornithine decarboxylase and spermidine synthase. *Life Sciences* 1984; 35: 1125–31.
11. Seiler N, Bolkenius FN, Rennert DM. Interconversion, catabolism and elimination of the polyamines. *Med Biol* 1981; 59: 334–46.
12. Andersson DJ, Crossland J, Shaw GG. The actions of spermidine and spermine on the central nervous system. *Neuropharmacology* 1975; 14: 571–77.
13. Lieber C. Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of liver diseases. *J Hepatol* 1999; 30: 1155–59.
14. Kok PJMJ, Seidel B, Holtkamp HC, Huisman J. A new procedure for the visualisation of multiple forms of gamma glutamyl transferase. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 209–16.
15. Marsh WH, Fingerhut B, Kirsch E. Adaptation of an alkaline phosphatase method for automatic colorimetric analysis. *Clin Chem* 1959; 5: 119–26.
16. Schiele F, Muller J, Colinet E, Siest G, Arzoglou P, Brettschneider H et al. Interlaboratory study of the IFCC method for alanine aminotransferase performed with use of a partly purified reference material. *Clin Chem* 1992; 38: 2365–71.
17. Russell HD, Medina JV, Syder HS. The dynamics of synthesis and degradation of polyamines in normal and regenerating liver and brain. *J Biol Chem* 1970; 245: 6732–33.
18. Inoue H, Mizutani A. A new method for isolation of polyamines from animal tissues. *Anal Biochem* 1973; 56: 408–16.
19. Quash G, Cologero H, Fossar N, Ferdinood A, Taylor D. Modification of diamine oxidase activity *in vitro* by metabolites of asparagine decarboxylation in normal and virus-transformed baby hamster kidney cells. *Biochem J* 1976; 157: 599–602.

20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–73.
21. Adibhatla RA, Hatcher JF, Sailor K, Dempsey J. Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Brain Research* 2002; 1: 30–8.
22. Muralikrishna Rao A, Hatcher J, Dempsey R. Polyamine response to CNS injury: for better or for worse? *Recent Research Developments in Neurochemistry* 1999; 2: 517–32.
23. Gilad GM, Gilad VH. Polyamines in neurotrauma. Ubiquitous molecules in search of function. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 401–7.
24. Henley CM, Wey K, Takashima A, Mills C, Granmayeh E, Krishnappa I et al. S-adenosylmethionine decarboxylase activity is decreased in the rat cortex after traumatic brain injury. *J Neurochem* 1997; 69: 259–65.
25. Paschen W. Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. *Mol Chem Neuropath* 1992; 16: 241–71.
26. Els T, Bruckmann J, Rohn G, Daffertshofer M, Monting JS, Ernestus RI et al. Spermidine: a predictor for neurological outcome and infarct size in focal cerebral ischemia? *Stroke* 2001; 32: 43–6.
27. Lee Y, Sayre LM. Reaffirmation that metabolism of polyamines by bovine plasma amine oxidase occurs strictly at primary amino termini. *J Biol Chem* 1998; 273: 19490–94.
28. Matsui I, Pegg AE. Induction of Spermidine N<sup>1</sup>-acetyltransferase by Dialkylnitrosamines. *Cancer Res* 1982; 42: 2990–95.
29. Berdinskikh NK, Lialushko NM. Polyamine levels and diamine oxidase activity in rat liver and kidneys during hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosodiethylglucanidine. *Exp Oncol* 1987; 9 (3): 23–7.

*Rad primljen: 17. 11. 2005*

*Prihvaćen za štampu: 15. 02. 2006*